Nº D'ORDRE : 81

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

GUY MARCHIS-MOUREN

1RE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA PURIFICATION DE LA LIPASE DE PORC ET A L'ÉTUDE DE L'ÉQUIPEMENT ENZYMATIQUE DU SUC PANCRÉATIQUE DE DIVERSES ESPÈCES

2E THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 20 Octobre 1959, devant la Commission d'Examen

Jury

Mr. le Doyen ROUARD *Président*

MM. DESNUELLE, NAUDET, ACHER — *Examinateurs*

Imprimerie M. LECONTE
98, Cours Lieutaud, 98
MARSEILLE
— 1959 —

N° D'ORDRE : 81

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

GUY MARCHIS-MOUREN

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA PURIFICATION DE LA LIPASE DE PORC ET A L'ÉTUDE DE L'ÉQUIPEMENT ENZYMATIQUE DU SUC PANCRÉATIQUE DE DIVERSES ESPÈCES

2e THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

Soutenues le *Octobre 1959, devant la Commission d'Examen*

Jury { Mr. le Doyen ROUARD *Président*
MM. DESNUELLE, ACHER } *Examinateurs*

Imprimerie M. LECONTE
98, Cours Lieutaud, 98
MARSEILLE
— 1959 —

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur : M. MARTY (F.)

Maître de Conférences de Mathématiques
(14 juin 1940)

Doyens honoraires : MM. MARCHAUD, TRAYNARD, CORROY, CHOUX

Professeurs honoraires : MM. MARCHAUD, TRAYNARD, PÉRÈS (J.), PETIT (G.), BOSLER (J.), THIRY (R.), TIAN (A.), MARGAILLAN (L.).

Doyen : M. ROUARD (P.)

Assesseur : M. CHOUX (P.) *Secrétaire principal :* M. MOYNAULT (C.)

Professeurs

Géologie et Minéralogie	MM. CORROY (G.).
Botanique Générale	CHOUX (P.).
Agronomie Tropicale	CERIGHELLI (R.).
Mécanique expérimentale des Fluides	VALENSI (J.).
Physique Générale	ROUARD (P.).
Chimie Biologique	DESNUELLE (P.).
Zoologie Générale	ABELOOS (M.).
Physique Industrielle	MERIGOUX (R.).
Calcul Différentiel et Intégral	VINCENSINI (P.).
Chimie Générale	CALVET (E.).
Physiologie Générale	BENOIT (P.).
Astronomie	FEHRENBACH (C.).
Mécanique Statistique de l'Atmosphère	FAVRE (A.).
Mécanique Rationnelle	CABANNES (H.).
Chimie Industrielle	GUILLEMONAT (A.).
Océanographie Biologique	PÉRÈS (J.-M.).
Chimie M. P. C.	CARPENI (G.).
Physique M. P. C.	JAUSSERAN (C.).
Biologie Végétale	MOLINIER (R.).
Physique M. P. C.	DOUCET (Y.).
Méthodes Mathématiques de la Physique	SOURIAU (J.-M.).
Electronique	COTTON (P.).
Chimie S. P. C. N.	METZGER (J.).
Biologie Animale S. P. C. N.	TIMON-DAVID (J.).

Professeurs sans chaire

Mathématiques Générales	MM. FOURÈS (L.).
Calcul des Probabilités	BODIOU (G.).
Chimie des Corps Gras	NAUDET (M.).
Physique Atomique et Moléculaire	MALE (D.).
Chimie Biologique	ACHER (R.).
Géologie appliquée	GOUVERNET (C.).
Chimie P. C. B.	SAVIDAN (L.).
Mathématiques M. P. C.	NAHON (F.).
Physique théorique	KASTLER (D.).
Mécanique des Fluides	Mlle CLARION (C.).

Maîtres de Conférences

Biologie Animale P. C. B.	MM. AMAR (R.).
Physique S. P. C. N.	BOUSQUET (P.).
Chimie théorique	JULG (A.).
Psycho-Physiologie	PAILLARD (J.).
Physique P. C. B.	PESTEIL (P.).
Mathématiques Générales (Institut de Nice)	WACHS (S.).
Physiologie animale	CHOUTEAU (J.).
Physique théorique	VISCONTI (A.).
Chimie M. P. C.	LEFEBVRE (J.).
Océanographie	DEVÈZE (L.).
Géologie	Mme TAXY (S.).

Chargés de Conférences

Physiologie	MM. GOUZON (B.).
Neurophysiologie	MORIN (J.).
Mathématiques	CHARLIER de CHILLY (V.).
Psycho-Physiologie	Mlle GAVINI (H.).
Physique	MM. JEAN (P.).
Chimie Biologique	SENEZ (J.).
Psycho-Physiologie	LANTIERI (S.).
Mathématiques	Mme COTTON (M.).
Océanographie	MM. BLANC (J.).
Neurophysiologie	GASTAUT (H.).
Pétrographie	Mlle GUEIRARD (S.).
Chimie M. P. C.	MM. BÉZAGUET (M.).
Biologie Végétale	MOLINIER (Roger).
Physiologie Végétale	RICARD (J.).
Ecologie terrestre et limnique	SCHACHTER (D.).

Contribution à l'étude de la purification de la lipase de porc et à l'étude de l'équipement enzymatique du suc pancréatique de diverses espèces

A MES PARENTS,

A MA FEMME,

A MON FILS,

A Monsieur le Professeur DESNUELLE,

hommage respectueux et reconnaissant.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

AVANT-PROPOS 11

CHAPITRE PREMIER

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. - La lipase pancréatique 13
1. POSITION DE LA LIPASE PARMI LES ENZYMES DE LA DIGESTION .. 13
2. MODE D'ACTION DE LA LIPASE SUR LES TRIGLYCÉRIDES 15

II. - Méthodes conventionnelles pour le fractionnement des protéines et en particulier des enzymes 17
1. FRACTIONNEMENT PAR LES SELS NEUTRES 18
2. FRACTIONNEMENT PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES 20
3. AUTRES MÉTHODES BASÉES SUR LES DIFFÉRENCES DE SOLUBILITÉ DES PROTÉINES 21

III. - La chromatographie des protéines 22
1. GÉNÉRALITÉS 22
2. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE 24
3. CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEURS D'IONS 25

IV. - La sécrétion externe du pancréas 29
1. COMPOSITION DU SUC PANCRÉATIQUE 29
2. STIMULATION DE LA SÉCRÉTION EXTERNE 30
3. LOCALISATION DES ENZYMES AU SEIN DES CELLULES 31
4. SYNTHÈSE DES ENZYMES PAR LE PANCRÉAS 32

CHAPITRE II

TECHNIQUES

I. - Mesure de l'activité de la lipase et des autres enzymes pancréatiques 33
1. MESURE DE L'ACTIVITÉ LIPASIQUE-ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE 33
a) *Description du test* ..... —
b) *Dosage des protéines totales - Activité spécifique* .... —
2. MESURES DES AUTRES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DU PANCRÉAS .. 34
a) *Cholestérol estérase* ..... —
b) *Phosphatidase A* ..... —
c) *Dosage des enzymes amylolytiques* ..... —
d) *Dosage des enzymes nucléolytiques* ..... —
e) *Dosage des enzymes protéolytiques* 35

II. - Préparation des supports de chromatographie 36
1. DÉRIVÉS DE LA CELLULOSE ..... —
a) *Préparation de la DEAE-cellulose* ..... —
b) *Préparation de la CM-cellulose* ..... —
c) *Caractéristiques de ces dérivés* 37
2. ALUMINE C_γ 38
3. PHOSPHATES DE CALCIUM 38
a) *Préparation du phosphate tricalcique* ..... —
b) *Préparation de la brushite* 39
c) *Préparation de l'hydroxylapatite* ..... —

PAGES

III. - **Chromatographie dans des colonnes** 39
1. APPAREILLAGE ..... —
2. PRÉPARATION DE L'ADSORBANT 40
3. REMPLISSAGE DE LA COLONNE ..... —
4. CARACTÉRISTIQUES DE LA COLONNE ..... —
5. CHARGEMENT DE LA COLONNE 41
6. ELUTION ..... —

IV. - **Récolte du suc pancréatique (cas du porc)** 41
1. TECHNIQUE DE FISTULATION ..... —
2. COLLECTION 43

CHAPITRE III

ESSAIS DE PURIFICATION DE LA LIPASE PAR DES TECHNIQUES CONVENTIONNELLES ET A PARTIR DU PANCREAS

I. - **Introduction** 44

II. - **Purification à partir de la pancréatine** 44
1. PRÉPARATION DE LA PANCRÉATINE 45
2. EXTRACTION DE LA LIPASE ..... —
3. PRÉCIPITATIONS FRACTIONNÉES PAR LE SULFATE D'AMMONIUM 46
4. PRÉCIPITATIONS FRACTIONNÉES PAR LES SOLVANTS 47
a) *Acétone* ..... —
b) *Ethanol* 49
5. AUTRES TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION FRACTIONNÉE 50
a) *Chauffage* ..... —
b) *Précipitation par variation du pH* ..... —
c) *Précipitation par abaissement de la force ionique* .. 51
6. TECHNIQUES D'ADSORPTION SÉLECTIVE ..... —
a) *Sur un gel de phosphate tricalcique* ..... —
b) *Sur un gel d'alumine Cγ* 52
c) *Sur une émulsion de triglycérides* 53
7. DISCUSSION ET CONCLUSIONS 54

III. - **Essais effectués à partir du pancréas** 56
1. ACTIVITÉ LIPASIQUE DU PANCRÉAS ..... —
2. LA LIPASE EST-ELLE DANS DES GRANULES DE ZYMOGÈNE ? ..... —
3. LA QUESTION DE LA PROLIPASE 57

CHAPITRE IV

LA CHROMATOGRAPHIE DE LA LIPASE PANCREATIQUE DE PORC

I. - **Essais préliminaires sur CM et DEAE-celluloses** 59
1. RECHERCHE DES CONDITIONS D'UNE CHROMATOGRAPHIE D'ÉQUILIBRE —
2. ADSORPTION ET ÉLUTION DE LA LIPASE AVEC LA CM-CELLULOSE .. 60
3. ESSAIS AVEC LA DEAE-CELLULOSE 61

II. - **Chromatographie de la lipase dans diverses colonnes** 62
1. CHROMATOGRAPHIE DANS DES COLONNES DE CM-CELLULOSE ET D'AMBERLITE IRC-50 62
a) *Chromatographie d'équilibre* ..... —
b) *Chromatographie dans des systèmes de composition variable* 64
2. CHROMATOGRAPHIE DANS DES COLONNES DE DEAE-CELLULOSE .. 65

PAGES

III. - **Chromatographie sur différents phosphates de calcium** 66
1. PHOSPHATE TRICALCIQUE 66
2. BRUSHITE 66
3. HYDROXYLAPATITE 67

IV. - **Utilisation de la chromatographie comme test d'homogénéité** .. 69

CHAPITRE V

ETUDE DU SUC PANCREATIQUE DE PORC ET DE CHIEN

I. - **Généralités** 71

II. - **Equipement enzymatique du suc pancréatique du porc et du chien** 72
1. EQUIPEMENT DU PORC 72
a) *Réalisation des expériences* ..... —
b) *Discussion* 75
2. EQUIPEMENT DU CHIEN 78
a) *Généralités* ..... —
b) *Chromatographie sur DEAE-cellulose* ..... —
c) *Chromatographie sur CM-cellulose* 79

III. - **Essais de purification de la lipase à partir du suc pancréatique de porc** 81
1. MÉTHODES CONVENTIONNELLES DE FRACTIONNEMENT 81
a) *Précipitation par* SO_4Am_2 ..... —
b) *Précipitation acétonique* 82
c) *Adsorption sur gel de phosphate de calcium et sur gel d'alumine* ..... —
2. ELECTROPHORÈSE DE ZONE SUR AMIDON 82

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 85

BIBLIOGRAPHIE 87

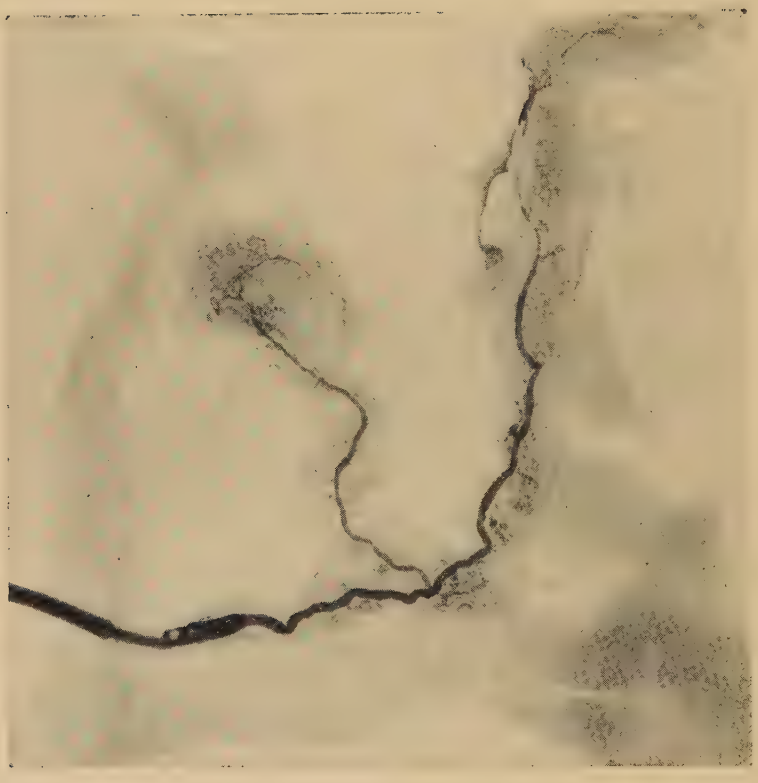


FIG. HORS-TEXTE. — *Radiographie du pancréas de porc.*

Une solution radioactive a été injectée dans les voies pancréatiques par l'intermédiaire de la sonde (en bas, à gauche). Les canaux excréteurs apparaissent ainsi dilatés. Cette radiographie nous a été communiquée par le Centre de Chirurgie Expérimentale de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

AVANT-PROPOS

La lipase représente l'un des enzymes fondamentaux de la digestion chez les animaux supérieurs. La purification d'un tel enzyme était digne de retenir l'attention, mais elle apparaissait de prime abord comme une entreprise difficile. En effet, de nombreux chercheurs (1) avaient déjà abordé cette étude et proposé divers schémas de purification. Par suite des résultats contradictoires et incomplets auxquels ils étaient parvenus, cette question n'avait guère progressé. Les causes de ces échecs sont multiples, la cause essentielle réside dans la détermination erronée de l'activité lipasique.

Au moment où je suis entré au Laboratoire de Chimie Biologique, M^me^ M.-J. Constantin et J. Baldy venaient de mettre au point un test satisfaisant pour la détermination quantitative de l'activité lipasique. Je me vis donc confier la tâche de purifier la lipase par les méthodes conventionnelles de précipitation fractionnée. Ce travail, première étape dans la purification de l'enzyme, avait pour but de fournir à des techniques de fractionnement plus sélectives telles l'électrophorèse et la chromatographie, un matériel lipasique enrichi. Puis je me consacrai à l'étude du comportement de la lipase dans divers systèmes chromatographiques. Cette longue étude fut un peu troublée par les difficultés rencontrées au cours de l'élution de l'enzyme.

Tout le travail précédent avait été réalisé à partir de pancréatine, c'est-à-dire à partir d'une poudre obtenue en traitant des pancréas de porc par l'acétone et l'éther. Plusieurs questions méritaient alors un examen sérieux : (*a*) La lipase ainsi purifiée à partir d'un matériel déjà traité était-elle bien identique à celle que le suc pancréatique déverse normalement dans le duodénum pour hydrolyser les graisses ; (*b*) la purification de la lipase à partir du suc pancréatique n'est-elle pas plus facile qu'à partir de la pancréatine ; (*c*) les deux procédés de purification permettent-ils d'obtenir un produit de même activité, ce qui constituerait un argument excellent en faveur de la pureté absolue de nos préparations ? Toutes ces études nécessitaient l'obtention de quantités importantes de suc pancréatique et par conséquent l'établissement d'une fistule permanente chez le porc. Grâce à l'obligeance de M. le Professeur Ferrando, Directeur de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, le Centre de Chirurgie Expérimentale de l'école que dirige M. le Professeur Marcenac, a accepté, à notre demande, de tenter une telle intervention. Ces essais tout à fait

originaux furent couronnés de succès et je pus collecter une quantité suffisante de suc pancréatique.

A ce moment-là, Keller et Neurath publièrent une remarquable technique chromatographique permettant de séparer sur un seul diagramme tous les enzymes du suc pancréatique de bœuf. En plus des questions énumérées précédemment, nous fûmes donc amenés à étudier l'équipement enzymatique du pancréas de porc, étude que, grâce à la complaisance de la Maison Sinbio à Nice, nous pûmes bientôt étendre au suc de chien. Cet ensemble de travaux nous amena à déterminer, en collaboration avec M^me^ Segond, Etudiante de 3^e^ Cycle, l'activité de nombreux enzymes pancréatiques.

⁂

Les pages suivantes fournissent tout d'abord quelques renseignements bibliographiques sur la lipase pancréatique, la sécrétion externe du pancréas, et les lois fondamentales de la chromatographie. Puis, les principales techniques utilisées au cours de mon travail expérimental sont sommairement décrites. Enfin, les résultats obtenus au cours de la purification de la lipase à partir de la pancréatine et du suc pancréatique, au cours de la chromatographie de la lipase de porc et enfin au cours de la chromatographie des protéines enzymatiques du suc pancréatique de diverses espèces animales font l'objet d'une discussion détaillée.

CHAPITRE PREMIER

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. - La lipase pancréatique

1. Position de la lipase parmi les enzymes de la digestion.

Les animaux supérieurs possèdent un équipement enzymatique adapté à la digestion des aliments ingérés. Le pancréas à lui seul sécrète les enzymes nécessaires à la digestion, c'est-à-dire à l'hydrolyse des trois grandes classes d'aliments, les polysaccharides, les protéines et les lipides. Ce sont : l'α-amylase, des enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidases A et B) et enfin la lipase qui va faire l'objet de la présente étude.

Les lipases appartiennent au groupe des estérases qui catalysent le transfert vers un accepteur d'un radical acyle prélevé sur un ester :

$$RCOOR' + AOH \rightleftharpoons RCOOA + R'OH$$

Quand AOH est l'eau, nous sommes en présence d'une hydrolyse classique. Quand AOH est un alcool, nous assistons à une réaction générale de transfert qui, dans le cas présent, est une estérification.

Les lipases ont déjà fait l'objet de nombreuses études (1) qui ont montré que les graisses sont digérées uniquement dans le duodénum. Autrement dit, il n'y aurait ni lipase salivaire, ni lipase gastrique, ni lipase intestinale. La lipase universellement reconnue est celle du pancréas. Ce qui ne veut pas dire que les lipases des bactéries de la flore intestinale ne jouent aucun rôle dans la digestion des lipides.

Au niveau du duodénum et en présence de bile, les triglycérides subissent grâce à la lipase des modifications de nature à permettre leur résorption par la paroi intestinale.

Aussi longtemps qu'un enzyme n'a pas été obtenu à l'état pur, cet enzyme ne peut pas être défini autrement que par l'activité qu'il manifeste. Autrement dit, les conditions expérimentales choisies pour le test d'activité de l'enzyme en question possèdent une importance déterminante par l'idée que nous nous faisons

de lui. Or, les lipases ont été étudiées dans des conditions très diverses et à l'aide d'une série de substrats (tributyrine, triacétine, butyrate de méthyle, Tweens, acétate et laurate de para nitrophénol, laurate et palmitate de β-naphtol, etc.) (1-12) ne présentant quelquefois qu'une analogie fort lointaine avec les véritables substrats physiologiques de la lipase, c'est-à-dire les triglycérides à longues chaînes. Aussi une grande confusion a régné pendant longtemps à propos des lipases, et ceci d'autant plus que le pancréas et d'autres tissus possèdent une activité estérasique mal définie que l'on peut aisément confondre avec l'activité lipasique.

De nombreux auteurs se sont efforcés depuis longtemps de baser la distinction entre lipases et estérases sur l'action supposée spécifique de certains inhibiteurs. En fait, le premier effort logique dans ce domaine est fourni par le récent travail de Sarda et Desnuelle (13). Ces derniers ont étudié l'activité de la lipase pancréatique purifiée sur différents esters en fonction de la concentration en substrat. Ils ont montré que l'enzyme n'agissait pas sur les molécules dissoutes dans l'eau ; mais lorsque la quantité de substrat est telle que la solution est sursaturée, c'est-à-dire lorsque des molécules d'esters se trouvent à l'état d'émulsion, l'activité lipasique se déclenche.

C'est ce phénomène qu'illustre la figure 1 relative à l'hydro-

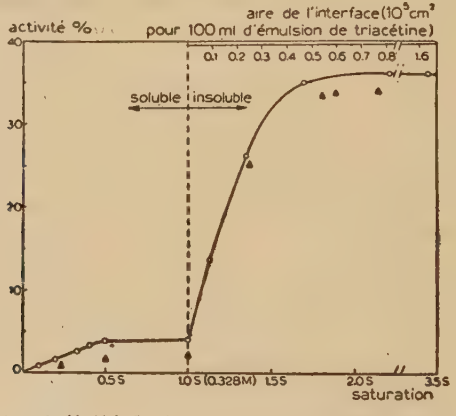


FIG. 1. — *Activité de la lipase pancréatique sur la triacétine en fonction de la quantité de substrat utilisé.*

Les ordonnées (activité p. 100) permettent de comparer l'activité de l'enzyme dans les conditions de l'essai et l'activité maximum qu'une quantité égale d'enzyme est susceptible de manifester vis-à-vis de la trioléine, cette activité maximum étant prise pour base 100. En d'autres termes, l'activité est dite de 30 p. 100, quand une quantité donnée de lipase libère dans un temps donné 30 milliéquivalents acides à partir de la triacétine et 100 milliéquivalents à partir de la trioléine, dans des conditions de « concentration » des émulsions correspondant aux plateaux des courbes de Michaelis.

o——o : Solution de lipase provenant d'un C_3 (activité spécifique : 400).

◆ : Lipase purifiée par électrophorèse (activité spécifique : 3 600).

lyse de la triacétine. A gauche de la ligne verticale en pointillé, nous sommes en présence d'une solution de triacétine dont la concentration augmente de gauche à droite. L'activité de la lipase sur de telles solutions est nulle ou très faible. A droite, nous entrons dans le domaine de l'émulsion, où l'activité lipasique se manifeste avec vigueur, selon les lois classiques de la théorie de Michaelis-Menten.

Dans le cas de l'estérase hépatique, au contraire, l'activité estérolytique se manifeste dès le début et elle ne subit aucun changement sensible quand la limite de solubilité est franchie. En d'autres termes, les lipases semblent donc être définies comme étant des estérases particulières agissant sur des substrats insolubles à l'interface séparant ces substrats et l'eau. On comprend d'autant mieux l'action spécifique de la lipase sur les esters en émulsion quand on se rappelle que les triglycérides alimentaires sont eux-mêmes insolubles, et se trouvent sous la forme d'une fine émulsion dans l'intestin grêle.

2. Action de la lipase sur les triglycérides.

Après avoir situé et défini la lipase pancréatique, précisons son mode d'action sur les triglycérides.

Dans l'intestin, la lipase réalise une hydrolyse des triglycérides. Mais, comme ces triglycérides possèdent trois fonctions ester, nous devons assister à trois hydrolyses qui, ne pouvant être simultanées pour des raisons de probabilité, sont consécutives. Nous allons donc écrire

$$T \underset{V_1}{\overset{V_1}{\rightleftharpoons}} D \underset{V_2}{\overset{V_2}{\rightleftharpoons}} M \xrightarrow{V_3} G$$

où T, D, M et G représentent respectivement les triglycérides, les diglycérides, les monoglycérides et le glycérol. Une série de travaux récents (14-17) ont montré qu'il existe des quantités importantes de di et de monoglycérides dans les mélanges issus de la lipolyse « in vitro » des triglycérides. Il est donc manifeste que la lipase hydrolyse plus rapidement les triglycérides que les diglycérides et ces derniers que les monoglycérides. L'accumulation des monoglycérides aux dépens des diglycérides est particulièrement importante en présence d'ions Ca++, pour une raison que nous allons discuter plus loin.

Le résultat de ces expériences in vitro suggère que la lipase est incapable d'hydrolyser complètement les triglycérides et que la vieille théorie selon laquelle la lipolyse d'une molécule de triglycéride doit fournir une molécule de glycérol et trois molécules d'acides gras, est fausse. Une telle proposition aurait des conséquences physiologiques importantes puisque l'on hésite encore pour savoir si l'intestin résorbe uniquement des acides

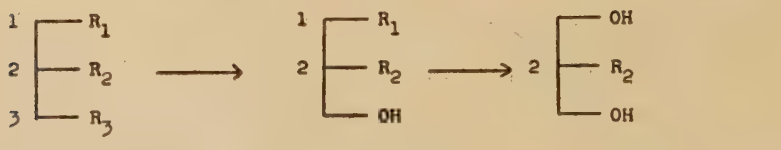
gras libres ou peut aussi résorber des glycérides issus d'une hydrolyse partielle.

Toutefois, les conditions de l'hydrolyse in vivo ne sont pas identiques à celles de l'hydrolyse in vitro. De plus, M^me^ Constantin vient de montrer dans ce Laboratoire que, même in vitro, la lipolyse devient pratiquement complète dès que l'on augmente les proportions de lipase par rapport à celles du substrat. Bien que l'on trouve des quantités appréciables de glycérides partiels dans l'intestin de rats en train de digérer de l'huile, le caractère incomplet de la lipolyse « in vivo » semble donc discutable ou plus exactement dépend de la composition de la ration. Seule la notion biochimique paraît être établie, selon laquelle les vitesses v_1, v_2 et v_3 de l'équation précédente décroissent fortement dans l'ordre $v_1 > v_2 > v_3$.

On remarque d'autre part dans cette équation que les deux premières réactions sont réversibles alors que la troisième ne l'est pas. Le caractère irréversible de la troisième réaction est certainement dû au fait que le glycérol est soluble dans l'eau. La lipase, destinée à agir sur des substrats insolubles, est ainsi incapable d'entrer en liaison avec le trialcool. On sait d'ailleurs que le précurseur de la resynthèse des glycérides dans la muqueuse intestinale n'est pas non plus le glycérol mais un intermédiaire de la dégradation du fructose diphosphate. Le caractère réversible des deux premières réactions explique enfin pourquoi les ions Ca++ lesquels mobilisent les acides gras libres sous la forme de savons insolubles, favorisent l'accumulation des monoglycérides en interdisant la resynthèse des diglycérides et des triglycérides.

Les travaux de Savary (18), de Mattson (19) et de Borgström (20) ont montré d'autre part que la coupure des chaînes grasses par la lipase ne se faisait pas au hasard. Il existe une spécificité de position. La lipase pancréatique hydrolyse les chaînes 1 et 3 (chaînes externes) des triglycérides bien plus vite que la chaîne 2 (chaîne interne).

La voie principale de la lipolyse est donc :
Triglycérides ⟹ Diglycérides-1,2 ⟹ Monoglycérides-2



Triglycéride mixte — Diglycéride-1,2 — Monoglycéride-2

Cette spécificité de position explique, dans une certaine mesure tout au moins, la propriété précédente, à savoir que $v_1 > v_2 > v_3$. L'enzyme trouve en effet deux chaînes en position

favorable dans les triglycérides, une seulement dans les diglycérides et point dans les monoglycérides.

Une telle propriété a été mise à profit par Savary (21-22) et par Mattson (22 *bis*) pour l'étude de la structure des glycérides mixtes naturels. Rappelons à cet égard que, loin d'associer trois chaînes grasses identiques dans un glycéride (trioléine ou tripalmitine) la nature a tendance à former des triglycérides mixtes où l'on trouve deux (dioléopalmitine) ou même trois (palmitooléolinoléine) chaînes grasses différentes. Il est donc du plus haut intérêt de connaître la répartition des chaînes grasses dans les positions externes et internes de ces molécules. L'étude a montré que la structure des glycérides mixtes naturels n'est jamais au hasard. Le caractère saturé ou insaturé des chaînes grasses influe manifestement sur la position qu'elles occupent au sein de ces glycérides. Les positions externes des glycérides sont principalement occupées par des chaînes saturées et la position interne, par une chaîne insaturée. Cette loi générale est particulièrement bien vérifiée chez les végétaux. Dans le beurre de cacao, par exemple, toutes les chaînes internes sont insaturées. Chez les animaux, le principe de constitution n'est pas aussi rigide mais la même tendance est constatée. La seule exception est le cas de la graisse de porc, où les chaînes insaturées sont au contraire à l'extérieur.

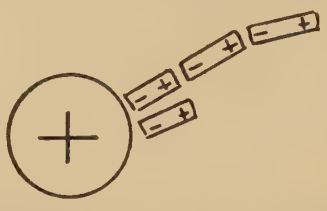
II. - Méthodes conventionnelles pour le fractionnement des protéines et en particulier des enzymes

Les protéines sont des macromolécules dont le diamètre est compris entre 1 et 100 millimicrons. Aussi, leur dissolution dans l'eau suit-elle les lois des colloïdes. Une solution de protéines est une dispersion colloïdale. La stabilité d'une telle dispersion dépend de plusieurs facteurs : poids, forme et surtout charge du colloïde. Ces particules étant animées du mouvement brownien, peuvent s'agréger après un choc. Quand le phénomène d'agrégation se développe au-delà d'une certaine limite, la dispersion casse, on passe à l'état de suspension et il y a sédimentation spontanée.

Lorsque les particules sont chargées, comme c'est le cas des protéines, la stabilité de la dispersion est considérablement augmentée. D'une part en effet, les particules possédant une charge de même signe, se repoussent. D'autre part, la particule chargée attire des ions de signe contraire au sien, et notamment elle s'entoure de plusieurs couches de molécules d'eau (H^+ OH^-). La molécule d'eau peut être considérée comme un dipole qui s'oriente au contact de la grosse particule suivant le schéma ci-après :

La couronne d'eau ainsi formée, c'est-à-dire l'eau d'hydratation des colloïdes lyophiles, constitue une couche protectrice qui augmente considérablement la stabilité de la dispersion. On

comprend ainsi que toutes circonstances qui altèrent le comportement électrique des molécules protéiques (pH, force ionique, nature des ions en solution, constante diélectrique du solvant) influent sur la stabilité et la solubilité des protéines.



Plusieurs techniques du fractionnement des protéines reposent précisément sur ces variations de solubilité qui se présentent de façon différente selon la protéine considérée. Le succès de la séparation dépend du contrôle précis de certaines variables : le pH, la force ionique, la température, la nature des ions présents, la concentration en protéines et la nature de l'agent de précipitation (sels neutres, solvants organiques).

1. Fractionnement par les sels neutres.

Les ions, nous l'avons vu, affectent la solubilité des protéines. Quand ils sont présents en petites quantités, ils collaborent à l'édification de la couronne protectrice. Ils augmentent donc la solubilité des protéines : c'est le phénomène du « salting in ». Pour de hautes concentrations, en sel, ils accaparent au contraire les molécules d'eau de la couronne en augmentant la pression osmotique du solvant. Il se produit alors un relargage de la protéine ou « salting out ».

La solubilité S des protéines décroît logarithmiquement lorsque croît la concentration en sel :

$$\text{Log } S = \beta - Ks\ \mu$$

Dans cette équation (équation de Debye-Hückel), la force ionique est proportionnelle à la concentration des ions présents et au carré de leur valence :

$$\mu = 1/2\ \Sigma\ C_i\ .\ Z_i^2$$

β est une constante représentant la solubilité (extrapolée) pour une force ionique nulle, et Ks représente la pente de la portion linéaire de la courbe de précipitation qui donne Log S en fonction de μ. Ks est beaucoup plus grand pour les protéines que pour de plus simples molécules, sa valeur est de 10 à 20 fois plus grande pour les molécules protéiques que pour les aminoacides.

A côté du chlorure de sodium, du sulfate de magnésium, des phosphates de potassium et du citrate de soude, le sulfate d'ammonium (Am) est le sel le plus souvent utilisé parce qu'il est

très soluble (760 g/litre à 20° C). On exprime la concentration du sel en % ou en degré de saturation, le symbole 0,5 S indiquant par exemple la demi-saturation. Le degré de saturation désiré peut être obtenu de plusieurs façons : soit en ajoutant une solution saturée, soit en ajoutant le sel à l'état solide, soit encore en mettant les protéines déjà précipitées et généralement sous forme de culot, en suspension dans une solution de saturation connue.

Indiquons dans chaque cas comment calculer la quantité de sulfate d'Am nécessaire.

a) Précipitation par la solution saturée S.

Soit y le nombre de ml de solution saturée à ajouter à 100 ml de solution de saturation S_1 afin d'obtenir 100 + y ml de solution S_2

$$y = \frac{100\ (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

b) Précipitation par le sulfate d'Am à l'état cristallisé. Le poids de sulfate d'Am à ajouter à 100 ml de solution de saturation S_1 afin d'obtenir une solution de saturation S_2 est :

$$x = \frac{0{,}1\ G\ (S_2 - S_1)}{1 - \frac{VG}{1000} S_2}$$

où G est le poids en g de sulfate d'Am contenu dans 1 litre de solution saturée et V le volume spécifique apparent du sulfate d'Am dans une solution saturée. A O°, G = 706,8 g

et $\frac{VG}{1000} = 0{,}271$.

Le pH des solutions concentrées en sulfate d'Am est à peu près neutre (entre 5 et 6). On maintient le pH à la valeur désirée par ajout de tampon. L'alcalinisation d'une solution de sulfate d'Am est d'ailleurs difficile, le sel ayant un effet tampon considérable à partir de pH 7,5.

Outre la concentration en sel et le pH, deux autres facteurs sont à contrôler : la température (le plus souvent à 0°) et la concentration en protéines qui est en général de 2 %.

Le fractionnement au sulfate d'Am est très souvent utilisé au laboratoire comme dans l'industrie. Kunitz (23) sépare de cette façon les enzymes protéolytiques du pancréas de bœuf. L'extrait sulfurique de pancréas est précipité à 0,2 S. Cette première fraction contient le trypsinogène. Entre 0,2 et 0,4 S, la désoxyribonucléase précipite en même temps que le chymotrypsinogène B (24). Entre 0,4 et 0,7 S, c'est le chymotrypsinogène A et il faut amener la concentration en sulfate d'Am à 0,8 S pour précipiter la ribonucléase.

2. Fractionnement par les solvants organiques.

Les protéines en solution s'attirent ou se repoussent suivant la nature de leurs charges. Les forces qui s'exercent entre deux protéines de charge q et q' à la distance r l'une de l'autre sont définies par la loi de Coulomb

$$F = \pm \frac{q \cdot q'}{D \cdot r^2}$$

où D est la constante diélectrique de la solution.

Ce phénomène explique l'action des solvants organiques miscibles à l'eau tels l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le propanol, le dioxane, l'éther, etc. En abaissant la constante diélectrique des solutions protéiques, les solvants augmentent les forces d'attraction mutuelle (F) entre les protéines de signes contraires. Il en résulte une perte de solubilité. L'action des solvants organiques ne se limite pas à abaisser la valeur de la constante diélectrique (D). Ces solvants provoquent aussi une désagrégation de la couche d'hydratation. Ce phénomène, comme dans le cas des sels, conduit à la précipitation. Il y aurait également un effet inverse de solvatation qui augmenterait la solubilité des protéines par échange entre l'eau liée et les molécules du solvant. On constate en fait la résultante de plusieurs effets qui provoquent dans la plupart des cas, la précipitation des protéines. Le solvant le plus utilisé est l'acétone, il est en effet soluble dans l'eau en toutes proportions. Son action dénaturante est en outre plus faible que celle de l'alcool.

Les concentrations d'acétone ou d'un autre solvant sont exprimées en %.

$$n\ \% = \frac{x}{v + x}$$

où v est le volume de la solution protéique et x celui de l'acétone à ajouter pour obtenir la concentration désirée (n %).

Plusieurs facteurs influent sur la précipitation. Le pH est maintenu par un tampon. On se place au pH qui correspond au minimum de solubilité de l'enzyme que l'on veut précipiter, donc au voisinage de son point isoélectrique. La force ionique doit également être définie car une faible concentration en sel augmente la solubilité (salting in). Enfin, la température est un facteur essentiel, au-dessus de 0° les risques de dénaturation sont grands. Aussi réalise-t-on généralement les précipitations aux environs de —10° C si le point de congélation du mélange eau solvant n'est pas supérieur à cette température.

Certains ions divalents comme le calcium, le baryum, le magnésium, le zinc diminuent la solubilité des protéines en formant des sels ou des complexes peu solubles. Le procédé de Cohn utilisé pour la séparation des protéines du plasma (25)

repose sur des précipitations fractionnées par l'éthanol. en présence de zinc.

3. Autres méthodes basées sur les différences de solubilité des protéines.

Il existe d'autres méthodes de précipitation sélective des enzymes, ce sont : la précipitation isoélectrique, la dialyse, la dilution, la formation de complexes et la dénaturation de protéines étrangères. Les protéines, nous l'avons vu, ont leur minimum de solubilité au point isoélectrique, de telle sorte que l'on peut précipiter certaines d'entre elles en portant le pH de leur solution à cette valeur. C'est le cas par exemple de la caséine dont la solubilité dépend peu de la force ionique mais beaucoup du pH. La caséine précipite si l'on amène le pH de sa solution à 4,7 simplement par ajout d'acide. De même, l'insuline précipite aux environs de pH 5. Un grand nombre de séparations a été ainsi réalisé.

Les euglobulines sont très sensibles à une variation de la concentration en sel de leurs solutions. Elles sont insolubles dans l'eau en l'absence de sel. Pour obtenir leur précipitation, on dialyse donc à fond pour éliminer les sels. Il existe divers types de dialyses : la dialyse à circulation continue, l'électrodialyse, la dialyse sous pression, la dialyse classique avec ou sans agitation...

De nombreuses globulines cristallisent lorsqu'on abaisse la force ionique de leur solution : la β lactoglobuline cristallise lorsqu'on a éliminé tous les sels par dialyse à son point isoélectrique aux environs de pH 5,2 (26). La dilution est un autre moyen d'abaisser la force ionique des solutions protéiques. La globuline cristalline de graine de courge est précipitée à froid par une dilution de 4 fois avec de l'eau bidistillée (27).

Certaines associations des protéines avec d'autres molécules ont été mises à profit dans leur fractionnement. Dans la purification de la triosephosphate deshydrogénase de la levure (28), Warburg et Christian par exemple précipitent sélectivement le nucléinate de l'enzyme à pH 4,5. La partie nucléique est ensuite éliminée par addition de protamine.

Rappelons simplement pour mémoire les associations des protéines avec les métaux lors des précipitations fractionnées par les solvants organiques.

Les protéines contractent également des associations avec leur substrat pour former le complexe enzyme-substrat. Cette propriété a été utilisée avec succès par Tayer au cours de la purification de l'amylase de Pseudomonas Saccharophilia (29). La solution contenant l'enzyme est passée à travers une colonne d'amidon qui retient l'enzyme plus ou moins spécifiquement. La même propriété a été évoquée pour ce qui concerne l'adsorption de la lipase par la tristéarine. Mais des phénomènes électro-

statiques non-spécifiques jouent vraisemblablement un rôle dans ces adsorptions.

Enfin, la dénaturation des protéines provoquée par une modification de la structure tertiaire de la molécule se traduit par une perte de solubilité. Cette observation a été mise à profit pour éliminer certaines impuretés protéiques gênantes dans la purification, le principal agent de dénaturation utilisé étant la chaleur. Le procédé a été employé avec succès au cours de la purification d'enzymes thermostables. L'aminopeptidase de porc est purifiée 4 fois par traitement à 70° C pendant 5 minutes (30). On sépare par chauffage l'activité des phosphatidases A et B, le dernier de ces enzymes étant thermostable tandis que l'autre est dénaturé par la chaleur (31). Dans le cas de la L aminoacidoxidase (32), l'effet stabilisateur dû au substrat est mis à profit, l'enzyme étant spécifiquement protégé par son substrat.

III. - La chromatographie des protéines

1. Généralités.

Deux techniques générales sont à notre disposition pour fractionner un mélange de protéines (P_1, P_2, P_3). La première, étudiée au paragraphe précédent, consiste à choisir des conditions expérimentales dans lesquelles la solubilité des trois protéines est différente. La deuxième consiste à mettre en mouvement les molécules protéiques par rapport aux molécules du solvant dans lequel elles sont en solution. Chaque type de protéine ayant un ensemble défini de propriétés physiques, il est improbable que toutes les molécules acquièrent la même vitesse. Il sera donc possible, au bout d'un certain temps, de les recueillir séparément. La mise en mouvement peut être provoquée par ultracentrifugation, électrophorèse, diffusion, chromatographie, etc.

La chromatographie repose sur le principe suivant : supposons que la solution s'écoule à travers un espace vide, les molécules P_1, P_2, P_3 et S se meuvent à la même vitesse et aucune séparation n'a lieu. Supposons maintenant que l'espace soit rempli d'une phase quelconque, non miscible avec le solvant S et pour laquelle les molécules P_1, P_2, P_3 ont une affinité plus grande que celle des molécules S. Les interactions entre P_1, P_2, P_3 d'une part et la phase d'autre part vont retarder ces molécules par rapport à celles du solvant. Les protéines vont donc prendre une vitesse propre qui sera caractéristique. P_1, P_2 et P_3 se sépareront et pourront être éluées successivement.

En principe, l'effet retardateur peut être exercé : (1) Par des phénomènes d'adsorption entre une phase solide et les molécules (chromatographie d'adsorption). (2) Par partage des molécules entre deux phases liquides non miscibles dont l'une est

immobilisée par un support solide et l'autre est mobile (chromatographie de partage). (3) Par des phénomènes d'attraction électrostatique entre une phase polaire et des molécules chargées de signe contraire (chromatographie par échange d'ions). En pratique, il n'est pas rare d'utiliser une chromatographie qui repose sur deux de ces principes ou même les trois à la fois. L'essentiel d'ailleurs est que la chromatographie soit efficace.

Au cours d'une chromatographie dans une colonne, l'effet retardateur est exprimé par le rapport :

$$R = \frac{\text{Chemin parcouru par les molécules P dans la colonne}}{\text{Chemin parcouru pendant le même temps par la surface libre du solvant en haut de la colonne.}}$$

On détermine facilement le R quand les molécules chromatographiées sont colorées, il suffit de noter le chemin parcouru par la bande colorée et celui parcouru pendant le même temps par le niveau supérieur du liquide. Dans les autres cas, on pose :

$$R = \frac{\text{Volume total de la colonne}}{\text{Volume du solvant correspondant à la sortie du soluté à la concentration maximum.}}$$

Quand les molécules ne sont pas du tout retenues, elles sortent avec « le volume mort » de la colonne, c'est-à-dire avec un volume de solvant égal à celui se trouvant dans la colonne, compte tenu du remplissage. Le R est alors plus grand que 1 par un facteur proportionnel au volume occupé par la phase solide.

La chromatographie des protéines pose des problèmes particuliers pour deux raisons principales : (1) Les molécules protéiques sont instables. Elles passent facilement, par modification de leur structure tertiaire, d'une forme initiale dite « native » à une forme plus ou moins dénaturée. Ce changement implique un bouleversement complet des propriétés, en particulier une tendance plus marquée à l'adsorption irréversible à des interfaces solide-liquide ou liquide-solide et la perte de l'activité biologique. Le fait pour une protéine de s'adsorber même transitoirement sur une interface provoque souvent une dénaturation sensible, c'est dire que la chromatographie des protéines est une entreprise difficile. Des résultats à peu près satisfaisants ne peuvent être obtenus qu'à condition de limiter la dénaturation en abaissant la température à 0° et même au-dessous de 0° quand le système de solvants le permet. (2) Etant des macromolécules possédant des dimensions souvent considérables, les protéines contractent difficilement des interactions avec une phase non-miscible à l'eau. Quand elles existent, ces interactions sont longues à établir. Il faut donc réduire beaucoup le débit des colonnes si l'on veut qu'un équilibre satisfaisant ait le temps de se réaliser.

2. Chromatographie de partage.

La séparation des protéines par distribution entre deux phases liquides est limitée par le nombre de couples de solvants non miscibles dans lesquels les protéines sont solubles et stables. Ce type de chromatographie est analogue dans son principe à la distribution à contre-courant. La seule différence est qu'au cours de la chromatographie de partage, l'une des phases liquides est immobilisée par un support solide pulvérulent, lequel doit être en principe inerte et ne contracter aucune interaction avec le soluté.

Une ampoule à décanter contient un couple de solvants. Introduisons un poids déterminé d'une protéine, présentant les caractères indiqués ci-dessus (solubilité-stabilité). Agitons, la protéine se partage entre les deux phases. Le rapport de sa concentration dans la phase supérieure C_1 et de sa concentration dans la phase inférieure C_2 est constant à une température donnée dans les limites de la solubilité dans les deux solvants. Ce rapport est appelé le coefficient de partage de la protéine considérée entre les 2 solvants (Loi de distribution de Nernst)

$$\alpha = \frac{C_1}{C_2}$$

Pour un couple de solvant donné, chaque protéine a un coefficient de partage caractéristique. Si l'on soumet un mélange de protéines à une série de partages par agitations et décantations successives dans une série d'ampoules, de manière à faire progresser les deux solvants en sens inverse, on sépare les constituants du mélange, si les coefficients de partage de ces constituants sont suffisamment différents dans les conditions de l'expérience.

Cette technique de distribution par contre-courant exige un appareillage coûteux et encombrant (surtout dans une chambre froide). Aussi est-il préférable d'utiliser la technique chromatographique.

Martin et Synge (33) ont développé une théorie de la chromatographie de partage. Ils découpent la colonne en plateaux théoriques et raisonnent comme dans le cas de la distillation fractionnée. Ils sont ainsi parvenus à l'équation reliant la vitesse du mouvement d'une zone au coefficient de partage

$$R_f = \frac{V_M}{V_E} = \frac{V_M}{V_M + \alpha V_F} \qquad (1)$$

où α est le coefficient de partage, V_F le volume occupé par la phase fixe dans la colonne, V_M le volume occupé par la phase mobile. Le volume d'émergence V_E est donné par l'expression :

$$V_E = V_M + \alpha V_F \qquad (2)$$

On détermine ainsi avec précision pour quel volume d'éluat la protéine considérée sortira de la colonne, connaissant son coefficient de partage entre les 2 phases, le volume de la phase fixe et celui de la phase mobile.

En divisant les deux membres de l'équation (2) par V_M, il vient :

$$\frac{V_E}{V_M} = 1 + \alpha \frac{V_F}{V_M} \text{ ou}$$

$$\frac{V_E}{V_M} = 1 + C$$

C est le coefficient de distribution.

Cette expression est équivalente à celle trouvée par Mayer et Tompkins (34) lors de l'étude théorique de la chromatographie d'échange d'ions.

La technique de la chromatographie de partage a été utilisée avec succès dans le cas de l'insuline et du lysozyme. Martin et Porter ont isolé les deux composants actifs de la ribonucléase de bœuf avec un système comprenant de l'éthylcellosolve, de l'eau et du sulfate d'Am (35). De nombreuses difficultés sont néanmoins rencontrées, dues principalement à la dénaturation par les solvants organiques, la dénaturation aux interfaces et la faible solubilité des protéines dans les solvants utilisés.

Afin d'avoir un guide pour la chromatographie de partage, on trace ce que l'on appelle des diagrammes de phases. Ce sont des diagrammes à 3 coordonnées, par exemple : solvant organique, eau, sulfate d'Am. On trouve sur ces diagrammes triangulaires des lignes de démixion qui permettent de déterminer la composition respective des deux phases pour chaque composition du mélange soumis à l'équilibre.

3. Chromatographie sur échangeurs d'ions.

Les brillants résultats obtenus pour les amino-acides et les peptides ont conduit les chercheurs à appliquer les techniques d'échanges d'ions pour la séparation des protéines. L'adsorption des protéines sur les résines synthétiques ou sur les dérivés de la cellulose fait intervenir de nombreux facteurs qui n'ont que peu d'importance dans la chromatographie de molécules plus simples. L'exemple le plus connu est le fait que les protéines ne sont pas retenues sur certaines résines parce que leur grande taille les empêche de diffuser dans les particules de résine.

L'adsorption se fait seulement sur la surface des particules. Si les grains de résine sont gros et le cross-link élevé, les protéines s'adsorbent donc très mal et peuvent de ce fait être éliminées : c'est ce phénomène que Partridge (36) appelle le tamisage molé-

culaire (*molecular sieve*). On a donc été conduit à fabriquer des résines à « cross-link » plus faible et à utiliser des grains de résine extrêmement fins, de manière à ce que les adsorbants aient une grande surface d'échange et par suite une capacité d'adsorption élevée. Les dérivés ioniques de la cellulose sont beaucoup plus poreux que les grains de résine. Ils possèdent donc une capacité beaucoup plus élevée. Le problème de l'adsorption une fois résolu, celui de l'élution doit être envisagé.

Le premier genre de chromatographie auquel on peut penser est la chromatographie dite d'équilibre. On équilibre la phase solide avec un tampon de pH et de force ionique déterminés, on dissout la protéine dans le tampon et on élue avec ce même tampon. En général, les conditions d'une chromatographie d'équilibre sont assez difficiles à trouver pour les protéines. On constate en effet que la vitesse de migration de ces substances dépend beaucoup du pH et de la force ionique du tampon. Une variation très faible de ces deux grandeurs fait passer brusquement de l'adsorption irréversible à une adsorption nulle.

Il y a chromatographie d'équilibre lorsque la vitesse d'élution est égale à celle d'adsorption, autrement dit, lorsque la protéine se partage suivant un coefficient de distribution fini entre la phase fixe et la phase mobile. Mayer et coll. (34) ont étudié le côté théorique de la question en découpant la colonne en plateaux théoriques. Chaque plateau p est constitué par une masse de résine m et un volume de solution v. Le coefficient de distribution du soluté dans un plateau est :

$$C = \frac{S_{np}}{L_{np}}$$

où L_{np} est la fraction du soluté dans la solution qui est en contact avec le plateau p quand le *nième* volume v est équilibré dans ce plateau, et S_{np} est la fraction du soluté dans la phase solide du plateau p quand le *nième* volume v est équilibré dans le plateau.

Pour relier cette théorie à celle de Martin et Synge, nous distinguerons le coefficient de distribution C du coefficient de partage α :

$$\alpha = \frac{C_1}{C_2} = \frac{C_f}{C_m}$$

est le rapport de 2 concentrations entre les phases 1 et 2 ou entre la phase fixe « f » et la phase mobile « m ».

$$C = \frac{C_f \times V_f}{C_m \times V_m}$$

Pour un plateau théorique, V_f est le volume de la phase fixe et V_m le volume de la phase mobile.

$$\text{ou } C = \alpha \frac{V_f}{V_m}$$

$$C = k\ \alpha$$

Mayers et Tompkin établissent l'équation :

$$F_{max} = C$$

où F est le nombre de volumes morts qui ont traversé la colonne. La vitesse de migration d'une protéine est fonction du coefficient de distribution du soluté entre la phase fixe et la phase mobile d'un plateau théorique. On peut donc prévoir, en principe, après une étude de rééquilibrage en tube, le comportement de la protéine considérée sur une colonne d'échangeur. Hirs et coll. ont fait cette étude dans le cas de la ribonucléase (37). Lors de l'étude préliminaire en tube, ils ont trouvé un coefficient de distribution compris entre 2 et 5. Ils pouvaient donc prévoir que l'enzyme sortirait de la colonne après passage de 2 à 5 volumes morts, à condition évidemment que le débit de la colonne soit tel qu'il puisse y avoir équilibre entre les deux phases. L'échangeur utilisé était l'Amberlite XE 64, résine acide polycarboxylique. La colonne était équilibrée par un tampon phosphate 0,2 M pH 6,47 ± 0,02, son diamètre était de 0,9 cm et sa hauteur de 30 cm. On place sur la colonne 1 à 2 ml de l'extrait sulfurique (0,25 N) de pancréas, que l'on a porté à pH 5,7 par addition de soude. Le chromatogramme montre l'existence de nombreux pics bien séparés. L'un d'eux possède l'activité ribonucléase. D'autre part, le diagramme obtenu avec la ribonucléase cristallisée du commerce contient 2 pics actifs que l'on a appelés ribonucléase A et B. Une chromatographie du même type a été réalisée pour le lysozyme et le cytochrome C.

Hirs, Stein et Moore (37) ont fait un très grand nombre d'essais en tube utilisant tous les adsorbants connus, avec diverses protéines et sous diverses conditions expérimentales. Ils ont trouvé que les protéines s'adsorbaient mais que dans presque tous les cas, les essais de rééquilibrage étaient vains, les protéines adsorbées ne repassant plus en solution. Le coefficient de distribution n'avait donc pas une valeur définie.

Quand cet inconvénient est constaté, la chromatographie d'équilibre ne peut pas être utilisée. L'élution est alors recherchée par une augmentation de la force ionique et/ou par une variation du pH de l'éluant. La chromatographie comprend alors 2 phases distinctes : (1) L'adsorption : Certaines des protéines du mélange s'adsorbent au sommet de la colonne. Les autres la traversent directement avec le volume mort. (2) L'élution : Elle peut se faire de deux façons, soit par étapes, en faisant passer successivement sur la colonne des liquides différents, soit par

gradient, la variation de composition de l'éluant étant alors progressive. La forme du gradient, qui peut être linéaire, concave, convexe ou même prendre grâce à l'utilisation d'un appareil spécial une allure complexe, constitue évidemment l'une des caractéristiques fondamentales de l'opération. Nous devons à Sober et Peterson (38-39) une série d'échangeurs d'ions dérivés de la cellulose par accrochage sur ce polymère de chaînes anioniques ou cationiques. Ces dérivés possèdent une haute capacité d'adsorption et relachent cependant les protéines adsorbées dans des conditions assez douces. Les auteurs ont ainsi séparés les protéines du sérum humain dans des colonnes de DEAE-cellulose (échangeur d'anions). La hauteur de la colonne était de 40 cm, son diamètre de 2,5 cm. Une telle colonne peut accepter jusqu'à 2 g de protéine. On applique un gradient d'élution qui est à la fois un gradient de pH (8,6-4) et de force ionique (0,005 - 0,5 M).

Sur DEAE-cellulose également, Keller et coll. (40) ont réussi à purifier la procarboxypeptidase de bœuf. L'élution est réalisée à pH constant par un gradient linéaire de force ionique (0,005 - 0,32). Neurath et coll. (41) ont séparé les différents constituants enzymatiques du suc pancréatique en chromatographiant les enzymes anioniques à pH 8 sur DEAE-cellulose. L'élution par gradient est la même que précédemment. Les protéines cationiques qui ont traversé directement la colonne avec le volume mort sont ensuite séparées par chromatographie sur colonne de résine acide (Amberlite XE 64) suivant la technique de Hirs, Stein et Moore (37).

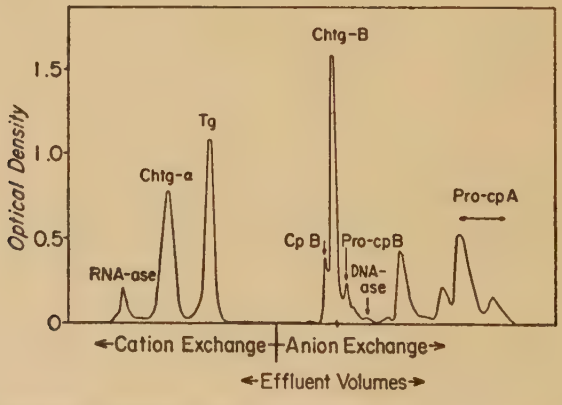


FIG. 2. — *Chromatogramme mixte des protéines cationiques et anioniques du suc pancréatique de bœuf.*

RNA-ase : Ribonucléase. Tg : Trypsinogène. ChTg-A : Chymotrypsinogène-A. DNA-ase : Désoxyribonucléase. ChTg-B : Chymotrypsinogène-B. Pro-Cp-B : Procarboxypeptidase-B. Cp-B : Carboxypeptidase-B. Pro-Cp-A : Procarboxypeptidase-A.

Le diagramme mixte reproduit dans la fig. 2 fait apparaître les divers constituants du suc pancréatique. A gauche, nous avons

les protéines cationiques séparées sur Amberlite et à droite les protéines anioniques séparées sur DEAE-cellulose.

L'utilisation de la chromatographie par échange d'ions a d'ailleurs donné lieu à de multiples applications dans le domaine des protéines. Les cas analysés précédemment ne sont donc donnés qu'à titre d'exemple.

IV. - La sécrétion externe du pancréas

1. Composition du suc pancréatique.

Le suc pancréatique contient des sels minéraux et des protéines. Sa teneur en l'un et l'autre de ces deux constituants présente des caractéristiques extrêmement intéressantes.

Pour ce qui concerne tout d'abord les sels minéraux, il faut noter la richesse particulière du suc en bicarbonate. Le tableau I indique les teneurs en ions Cl^- et HCO_3^- de quelques liquides extracellulaires. On voit que le suc pancréatique est le plus riche en bicarbonate et, corrélativement, l'un des moins riches en chlorure. La comparaison est particulièrement intéressante avec le plasma dont la composition en électrolytes doit être prise pour référence.

Tableau I

Anions (milliéq. par litre) des divers liquides extracellulaires

Liquides	Cl^-	HCO_3^-	pH
Plasma	103	28	7,35 - 7,45
Liquide cérébro-spinal.	125	25	7,4
Larmes	115	10 - 20	5,2 - 8,0
Sueur	85	5 - 25	5 - 7,5
Salive	60-80	0 - 10	6,4 - 7,0
Sécrétion gastrique ...	145	0	1 - 2
Bile	75-110	25 - 50	7,4 - 8,0
Suc pancréatique	80	80	7,2 - 8,2

Ce bicarbonate provient cependant du plasma, comme l'ont montré des expériences réalisées à l'aide de $^{14}CO_3HNa$ radioactif. Un mécanisme spécial doit donc le concentrer, afin de mieux neutraliser le contenu gastrique au moment de son entrée dans le duodénum.

L'équipement enzymatique du pancréas est également remarquable. La fig. 2 nous a déjà montré comment on peut séparer

les enzymes pancréatiques par chromatographie. Le tableau II indique les proportions relatives des pics du diagramme par rapport aux protéines totales du suc de bœuf.

TABLEAU II

Proportions des divers pics de la fig. 2 (cas du bœuf)

Les pourcentages sont calculés par rapport aux protéines totales du suc.

Nom du pic	%	Point isoélectrique
Trypsinogène	14	9,3
Chymotrypsinogène A	16	9,1
Chymotrypsinogène B	16	5,2
Procarboxypeptidase B	7	—
Procarboxypeptidase A	19	4,6
Total des enzymes protéolytiques.	72	
Ribonucléase	2,4	7,8
Desoxyribonucléase	1,4	5,0
Non identifié	10	
Total général	86	

On voit dans ce tableau que la somme des pics fait à peu près 85 % des protéines totales. Si chaque pic contient bien uniquement l'enzyme dont il porte le nom, il en résulterait la conséquence importante qu'au moins 85 % des protéines du suc sont des enzymes. En somme, le suc serait une solution d'enzyme dans du bicarbonate dilué.

Une telle conclusion peut sembler un peu prématurée pour diverses raisons qu'il serait trop long de discuter en détail ici. Il n'en reste pas moins que l'équipement enzymatique du suc pancréatique est remarquable et que, sans aucun doute, une forte proportion des protéines de ce suc sont des enzymes.

2. STIMULATION DE LA SÉCRÉTION EXTERNE.

Une étude précise de la stimulation de la sécrétion pancréatique est de caractère beaucoup trop physiologique pour trouver sa place dans la présente thèse. Nous voulons néanmoins rappeler certains faits fondamentaux de nature biochimique qui ont un rapport direct avec notre travail.

Grâce à l'utilisation intensive d'animaux porteurs d'une fistule naturelle ou artificielle, on sait depuis longtemps que la sécrétion pancréatique, comme d'ailleurs celle de la bile, n'est pas continue. Elle se déclenche par exemple quand on introduit dans le duodénum certaines substances alimentaires comme les triglycérides, les peptones, les acides gras, etc.

On considère généralement que la stimulation issue du duodénum est transmise au pancréas par deux voies : la voie nerveuse par le système vague et la voie hormonale. Deux hormones ont été jusqu'ici identifiées. Tout d'abord la sécrétine qui est en fait l'hormone la plus anciennement connue. Cette sécrétine a été récemment purifiée complètement et analysée par divers auteurs suédois. Il s'agit d'un polypeptide relativement petit (P.M. : 5 000 environ).

Bien que les essais physiologiques réalisés jusqu'ici aient employé de la sécrétine impure, diverses combinaisons sont maintenant considérées comme valables concernant le mécanisme d'action de cette hormone. Quelques minutes après l'injection de sécrétine, on observe la sortie d'un suc épais relativement riche en enzymes. Puis le suc devient plus fluide et la teneur en enzyme baisse considérablement. C'est ce qui fait quelquefois considérer que la sécrétine ne provoque pas la mobilisation proprement dite des enzymes du pancréas, mais uniquement l'écoulement d'un liquide riche en bicarbonate. La mobilisation des enzymes serait provoquée par une autre hormone, la pancréozymine au sujet de laquelle les renseignements sont encore rares. Il serait du plus haut intérêt d'entreprendre une étude systématique sur la teneur en enzymes du suc pancréatique, maintenant que l'on dispose de méthodes précises et spécifiques pour la détermination des diverses activités enzymatiques.

3. Localisation des enzymes au sein des cellules.

Des études histologiques ont suggéré depuis longtemps que les cellules pancréatiques responsables de la sécrétion externe possèdent des éléments autonomes qui, au moment de la sécrétion, se rapprochent des membranes et semblent disparaître au moins partiellement. On en a déduit que les enzymes n'étaient pas distribués uniformément dans tout le protoplasme cellulaire, mais qu'ils étaient concentrés dans des granules, appelés « granules de zymogènes ». Ces granules seraient ainsi solubilisés par un mécanisme d'ailleurs inconnu au moment de la sécrétion. Les expériences de Hokin (42) paraissent confirmer la conception des granules de zymogènes. Après avoir homogénéisé du pancréas de chien, cet auteur trouve en effet que l'activité lipase est présente, non pas dans la solution, mais dans une fraction sédimentable par centrifugation à vitesse modérée.

Toutefois, si cette conception était exacte, on devrait penser que les granules ont la même composition et que les proportions

relatives des divers enzymes dans le suc pancréatique doivent par conséquent rester constantes quel que soit le mode de stimulation. Quelques travaux (43-45) semblent en effet avoir montré que la concentration totale des enzymes pouvait varier dans de larges limites sous l'influence de diverses stimulations, sans que les proportions relatives des enzymes aient été sensiblement changées.

Néanmoins, une certaine adaptation au constituant prédominant du régime semble se manifester dans des expériences de longue durée. C'est ainsi, par exemple, qu'après trois semaines d'un régime riche en sucre, le suc pancréatique du chien devient plus riche en amylase et moins riche en trypsine (45). Cette question d'une possibilité d'adaptation enzymatique au niveau des animaux supérieurs présente un grand intérêt, étant donné ce que l'on sait de l'adaptation enzymatique chez les êtres unicellulaires.

4. Synthèse des enzymes par le pancréas.

Nos connaissances concernant la biosynthèse des protéines étant encore fort incomplètes, il n'est pas étonnant que le cas particulier représenté par la biosynthèse par le pancréas des enzymes de la digestion soit encore loin d'être élucidé. Un tout récent travail de Keller et coll. (46) fait suite à une série de travaux anciens et imprécis (47, 48). Les auteurs américains ont injecté 250 mg de L-cystine contenant l'isotope radioactif ^{35}S à un bœuf de 200 kg porteur d'une fistule pancréatique permanente. Le suc a été recueilli pendant 8 h en changeant le récipient récepteur toutes les heures. Dans les 8 fractions, on a séparé les enzymes par chromatographie (voir plus haut) et on a mesuré la radioactivité manifestée par les pics de trypsinogène, chymotrypsinogène-A et de ribonucléase. Dans tous les cas, la radioactivité spécifique était à son maximum au bout de 3 h environ. Cette radioactivité diminuait ensuite selon une réaction du 1er ordre dont la constante de vitesse a été mesurée. Ces expériences ont permis de montrer que, chez un bœuf en période de sécrétion constante, le pancréas met environ 155 min. pour synthétiser une quantité de zymogène égale à sa réserve normale et 127 min. dans le cas de la synthèse de la ribonucléase. Il s'agit donc de processus synthétiques extrêmement rapides. En outre, quelques indications ont été recueillies suggérant que la synthèse des deux zymogènes protéolytiques (trypsinogène et chymotrypsinogène) s'effectue à partir d'amino-acides libres, tandis que la synthèse de la ribonucléase suit une voie plus compliquée, impliquant peut-être dans une première étape, l'élaboration de peptides qui sont ensuite soudés les uns aux autres.

Tous ces résultats sont évidemment de caractère préliminaire, ils indiquent cependant une voie d'exploration d'un grand intérêt en ce qui concerne l'étude du fonctionnement du pancréas en tant que glande de la digestion.

CHAPITRE II

TECHNIQUES

I. - Mesure de l'activité de la lipase et des autres enzymes pancréatiques

1. Mesure de l'activité lipasique - Activité spécifique.

a) *Description du test.*

On fait agir la lipase à l'interface d'une fine émulsion de triglycérides. Dans 400 ml de solution (refroidie) à 10 % de gomme arabique violemment agitée dans un mixer à lames rotatives, on verse 70 ml d'huile d'olive. On agite 10 minutes en ajoutant de la glace pour éviter tout échauffement. Les globules de l'émulsion examinés au microscope ont un diamètre moyen de 2 microns.

Dans un bécher plongé dans un bain-marie à 37° on mélange 10 ml de l'émulsion d'huile d'olive, 8 ml de tampon Tris pH 9 0,005 M, 10 ml d'eau distillée, 1 ml de taurocholate de Na à 6,6 %. On plonge dans ce bécher les électrodes d'un pH-mètre et grâce à une burette automatique, on amène le pH à 9,2 par addition de soude 0,1 N. On ajoute alors la solution enzymatique (généralement 1 ml) et on titre directement les acides gras libérés en maintenant le pH constant par addition de la quantité convenable de soude. La réaction est d'ordre zéro pendant la durée de l'expérience. La quantité d'enzyme est directement mesurée par la pente de la droite de cinétique :

$$V = k\ (E)$$

On définit l'unité lipase comme étant la quantité d'enzyme libérant 10 µ équivalents acides par minute.

b) *Dosage des protéines totales - Activité spécifique.*

La technique la plus généralement employée pour doser les protéines est la mesure d'absorption de leurs solutions à 280 mµ. Cette méthode n'est pas cependant directement utilisable lorsque la solution contient un corps absorbant dans l'ultra-violet (acétone). D'autres substances à caractère osmotique (acides nucléiques) donnent également une forte absorption à 280 mµ. Aussi a-t-on préféré le plus souvent utiliser la technique de dosage de Lowry. Cette méthode colorimétrique est en effet plus spécifique

puisqu'elle permet de doser à la fois les liaisons peptidiques (réaction de Biuret) et les noyaux phénols (dosage de Folin).

Une courbe de référence tracée avec de la sérum albumine de bœuf permet par convention d'exprimer les résultats en mg d'azote protéique. Une correspondance assez satisfaisante a pu être établie avec la méthode spectrophotométrique. L'activité spécifique des solutions est le nombre d'unités lipase pour 0,5 mg d'azote protéique.

2. Mesure des autres activités enzymatiques du pancréas.

a) *Cholestérolestérase.*

La cholestérolestérase est dosée suivant la technique néphélométrique de Hernandez et Chaikoff (49). Le cholestérol et l'acide oléique dispersés dans du tampon phosphate 0,154 M pH 6,15 donnent des solutions claires en présence de sels biliaires. L'action synthétisante de la cholestérolestérase engendre de l'oléate de cholestérol, lequel n'est pas soluble dans les conditions du test. L'émulsion précédente se trouble. Le test se fait à 37°. On estime la formation du trouble au spectrophotomètre à 600 mμ.

b) *Phosphatidase A.*

Plusieurs techniques de dosage ont été étudiées (Hanahan, Shapiro). Nous avons retenu celle de Fairbairn (50). On utilise comme substrat les phospholipides totaux du cerveau de bœuf. Après hydrolyse, les acides gras sont extraits et titrés par la soude 0,02 N.

c) *Dosage des enzymes amylolytiques.*

L'α-amylase est le seul enzyme amylolytique présent dans le suc pancréatique. Son dosage consiste à mesurer l'augmentation du pouvoir réducteur apparu lors de l'hydrolyse de l'amidon (51).

Substrat : Amidon soluble (Merck) à 1 % dans du phosphate 0,02 M, pH 6,9. Réactif : 1 g d'acide 3-5 dinitrosalycilique est dissous dans 20 ml de soude 2 N. On ajoute 30 g de tartrate de sodium et de potassium. On amène à 100 ml avec de l'eau. Dosage : 1 ml d'une solution enzymatique est incubé à 25° C pendant exactement 3 minutes avec 1 ml de substrat. On ajoute alors 2 ml de réactif. On porte ce mélange pendant 5 min. à 100° C. On refroidit et on ajoute 10 ml d'eau. On fait la lecture au colorimètre Coleman à 420 mμ. La courbe de référence est tracée avec du maltose. Une unité d'amylase correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 mg de maltose en 3 min. L'activité spécifique est le nombre d'unités par mg de protéines.

d) *Dosage des enzymes nucléolytiques.*

(1) La désoxyribonucléase (DNAase) dépolymérise le DNA. La réaction se manifeste par une augmentation de l'absorption

à 260 mμ [Kunitz (52)]. L'unité d'enzyme est la quantité qui provoque une augmentation de densité optique de 0,001 par min. à 260 mμ (2). La ribonucléase (RNAase) est dosée suivant la méthode spectrophotométrique de Kunitz (23). La RNAase hydrolyse le RNA avec production de mononucléotide. Pendant l'hydrolyse, on constate une diminution de l'absorption à 300 mμ. Le dosage de Kunitz est basé sur cette observation.

e) *Dosage des enzymes protéolytiques.*

(1) Trypsine et chymotrypsine. — La mesure de l'activité de la trypsine et de la chymotrypsine est basée sur les propriétés estérasiques de ces enzymes. Les dosages sont effectués après activation trypsique de leurs zymogènes respectifs.

Pour le dosage de la trypsine, on utilise comme substrat le N-benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE), le dosage potentiométrique se fait à pH 8 en présence de calcium suivant une technique analogue à celle utilisée pour le dosage de la lipase. L'activité spécifique est le nombre de milliéquivalents basiques consommés dans les conditions du test par min. et par mg d'azote protéique. Pour la chymotrypsine, on utilise comme substrat l'acétyl-L-tyrosine éthyl ester (ATEE). Le dosage se fait également à pH 8 dans les mêmes conditions que pour la trypsine. La définition de l'activité spécifique est la même que précédemment.

(2) Carboxypeptidases. - Dosage de la Cp-A. — La Cp-A se trouve sous forme de Pro Cp-A dans le suc pancréatique. On doit donc l'activer par la trypsine avant de la doser. Le substrat utilisé est le carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine. A la méthode colorimétrique sur papier (révélation à la ninhydrine de la phénylalanine libérée) nous avons préféré le titrage direct au pH stat de l'acidité apparue à pH 8 pendant la rupture d'une liaison peptidique.

Dosage de la Cp-B. — On utilise comme substrat l'hippuryl-L-arginine. On révèle l'arginine après chromatographie sur papier.

(3) Dosage de l'activité estérasique sur l'acétate de para-nitrophénol. — L'hydrolyse de l'acétate de para-nitrophénol libère un corps coloré : le nitrophénol. Le dosage est basé sur le développement de cette coloration (méthode de Huggins et Lapides) (54). On effectue le dosage sur le mélange suivant : 7 ml de tampon phosphate 0,066 M pH 7, 1 ml de substrat, x ml de solution enzymatique, 2 — x ml d'eau. On mesure à 400 mμ l'augmentation de densité optique obtenue en 20 min. La cinétique est rectiligne, la pente de cette droite permet de définir l'unité d'activité : c'est la quantité d'enzyme libérant en 20 min. à 25° 1 μ-mole de para-nitrophénol.

II. - Préparation des supports de chromatographie

1. Dérivés de la cellulose.

La diéthylaminoéthyl-cellulose ou DEAE-cellulose a été préparée en faisant réagir les groupements OH de la cellulose avec le chlorhydrate du chlorure de 2-diéthylaminoéthane suivant la réaction :

$$X — OH + ClCH_2 — CH_2 — N\,(C_2H_5)_2 \longrightarrow$$
$$X — O — CH_2 — CH_2 — N\,(C_2H_5)_2 + H\,Cl$$

Il s'agit donc d'un composé faiblement basique fonctionnant en échangeur d'anion. La carboxyméthyl-cellulose ou CM-cellulose est obtenue en faisant réagir les groupements OH de la cellulose avec l'acide monochloracétique suivant la réaction :

$$X — O\,H + ClCH^2 — COOH \longrightarrow X — O — CH^2 — COOH + HCl$$

C'est donc un composé faiblement acide fonctionnant en échangeur de cation. Les deux composés ont été préparés suivant la méthode de Sober et Peterson (38).

a) *Préparation de la DEAE-cellulose.*

Une solution de soude (40 g dans 170 ml) est malaxée avec 60 g de cellulose de bois résineux (Solka Floc SWA40). On place le mélange dans un bain de glace pendant 30 minutes, en agitant de temps à autre. On ajoute en plusieurs fois une solution de chlorhydrate de chlorure de 2-diéthylaminoéthane (35 g dans 45 ml d'eau). Lorsque le mélange est bien homogène, on le porte à 80-85° C et on le maintient à cette température pendant 35 min. Le produit est refroidi et 250 ml de NaCl 2 M sont ajoutés en plusieurs fois.

On obtient une suspension épaisse que l'on filtre sur verre fritté. Le « gâteau » ainsi obtenu est lavé successivement par NaOH et HCl N. Puis il est mis en suspension dans 250 ml de NaOH N et transféré dans un grand récipient. On amène à 3 l avec de l'eau et on lave plusieurs fois par décantation en éliminant chaque fois les particules les plus fines qui ne sédimentent pas. On filtre et on sèche la DEAE-cellulose ainsi obtenue par de l'alcool absolu. On obtient environ 45 g de poudre blanche légèrement fibreuse.

b) *Préparation de la CM-cellulose.*

Une solution de soude (90 g dans 200 ml) est malaxée avec 60 g de cellulose de coton (poudre Whatman). On laisse reposer le mélange dans un bain de glace pendant 30 minutes en agitant de temps à autre. On ajoute en 3 ou 4 portions une solution d'acide monochloracétique (30 g dans 40 ml d'eau). La pâte obtenue est alors chauffée à 70° C pendant 20 min. en agitant occasionnellement. Le mélange devenu jaune est refroidi et mis en suspension dans 500 ml d'acide acétique à 10 %.

Le volume de la suspension est amené à 2 l avec de l'eau. On laisse sédimenter puis on lave plusieurs fois le sédiment jusqu'à ce que le surnageant devienne clair, incolore et neutre. On ajoute alors 10 ml environ d'acide acétique glacial pour le rendre juste acide au rouge Congo. Après décantation, on filtre sur verre fritté et on lave avec de l'eau jusqu'à ce que le filtrat ne soit plus acide. On sèche comme précédemment le gâteau avec de l'alcool absolu. On obtient 25 g d'une poudre blanche extrêmement légère.

c) *Caractéristiques de ces dérivés.*

Ces dérivés sont caractérisés : (*a*) Par la grosseur de leurs grains. On les tamise à travers des tamis de 200 et 400 mailles, et on conserve la fraction 200-400. (*b*) Par le nombre de groupements fixés. On détermine la quantité de groupements acides ou basiques fixés en traçant la courbe de titrage de l'adsorbant étudié. Ces courbes (voir fig. 3) ont été tracées à l'aide du titrigraphe automatique Radiometer pour un poids donné de poudre de 40 à 50 mg.

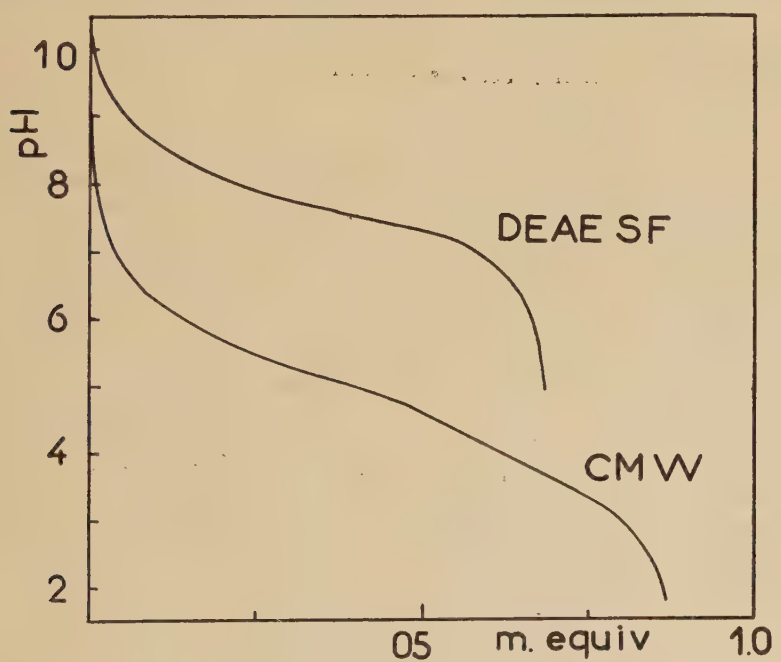


Fig. 3. — *Courbes de titrage des dérivés ioniques de la cellulose.*

En abscisse, les milliéquivalents correspondent aux quantités de HCl 0,1 N versées au cours du titrage, déduction faite des quantités versées pendant une opération identique pratiquée avec un même volume d'eau.

On ajoute la quantité de soude nécessaire pour que les

carboxyles de la CM-cellulose soient complètement dissociés (forme COO—Na+) et pour que la DEAE-cellulose ait ses groupements aminés sous la forme non ionisée. On titre en retour par l'acide chlorhydrique 0,1 N.

Dans les 2 cas, on obtient une courbe en forme de S avec une descente rapide, une partie moins inclinée qui présente un point d'inflexion en son milieu, puis une nouvelle retombée correspondant à la fin du titrage ; la CM. est alors totalement désionisée (forme COOH) et la DEAE au contraire est sous forme ionisée. On voit que les pK des deux dérivés sont, respectivement, 4,9 et 7,8. Le nombre de milliéquivalents acides fixés est déterminé par la quantité de HCl versée entre les deux asymptotes aux branches verticales de la courbe. Nous trouvons 0,81 milliéquivalents acides par gramme de CM. et 0,75 milliéquivalents par gramme de DEAE. Notons que ces courbes n'ont pas été obtenues directement par le titrigraphe. Elles sont la résultante de 2 courbes, la courbe expérimentale tracée avec le dérivé et la courbe tracée avec le même volume d'eau en omettant d'ajouter le dérivé. On retranche les quantités de HCl versées dans le cas de l'eau, de celles versées en présence du dérivé, la correction est importante surtout pour la partie acide de la courbe de la CM.

2. Alumine Cγ (Al_2O_3 3 H_2O).

Cet absorbant est préparé suivant la technique de Willstätter (55). Une solution chaude de 30 g de sulfate d'aluminium et d'ammonium dans 500 ml d'eau est versée d'un seul coup dans 3,25 l d'une solution contenant 100 g de sulfate d'ammonium et 215 ml d'ammoniaque à 20 %. Pendant la précipitation et pendant le quart d'heure qui la suit, le mélange est agité vigoureusement, la température étant supérieure à 60° C. Le mélange est dilué à 20 l. On lave le précipité 3 fois par décantation. 40 ml d'ammoniaque à 20 % sont ajoutés au cours du quatrième lavage pour enlever les dernières traces de sulfate d'ammonium basique. Puis, les lavages à l'eau distillée reprennent jusqu'à ce que le précipité devienne très léger et mette plusieurs jours à sédimenter. On laisse vieillir le gel pendant 3 mois. Au bout de cette période il se trouve sous la forme stable Cγ.

3. Phosphates de calcium.

a) *Phosphate tricalcique : Ca_3 $(PO_4)_2$.*

La préparation de ce gel se fait suivant la technique de Keilin et Hartree (56). 150 ml d'une solution de $CaCl_2$ (132 g de $CaCl_2$ 6 H_2O par litre) est amenée à un volume de 1 600 ml avec de l'eau et agitée avec 150 ml d'une solution de phosphate trisodique (152 g de Na_3PO_4 par litre). Le pH du mélange est amené à 7,4 par l'acide acétique dilué, le précipité est lavé par décantation 3 ou 4 fois avec de grands volumes d'eau (15 à 20 l)

puis il est centrifugé. Deux caractéristiques : (*a*) L'âge du gel : Le gel utilisé est âgé de plus de deux mois. (*b*) Son poids sec est égal au 1/20 de son poids réel.

b) *Préparation de la brushite : Ca H PO_4 - 2 H_2O.*

On prépare cet adsorbant suivant la technique de Tiselius et coll. (57). On mélange volume à volume, en versant goutte à goutte l'un des constituants dans l'autre, une solution de phosphate disodique 0,5 M et de $CaCl_2$ 0,5 M. On lave au moins 5 fois le précipité par décantation avec le même volume d'eau jusqu'à ce que le surnageant ne précipite plus l'un des constituants.

La brushite n'est pas stable à des pH supérieurs à 7. Avec le temps, elle subit également des modifications, aussi n'utilisons-nous jamais de brushite vieille de plus de 2 mois.

c) *Préparation de l'hydroxylapatite : Ca_3 $(PO_4)_3$ OH.*

La préparation de ce gel se fait suivant la technique de Tiselius et coll. (57). On obtient un précipité de brushite de la même manière que précédemment en mélangeant 2 l de phosphate disodique et 2 l de $CaCl_2$. On lave par décantation. On amène la suspension à 4 l avec de l'eau distillée, et on ajoute 100 ml d'une solution de soude à 40 %. Le mélange est maintenu à ébullition pendant 1 h. Le précipité est à nouveau lavé 4 fois par décantation avec de l'eau. Du tampon phosphate pH 6,8 0,01 M est alors ajouté et la solution est chauffée jusqu'à son point d'ébullition (ne pas la faire bouillir). On lave à nouveau par du tampon phosphate et l'on fait bouillir pendant 5 min. L'opération est répétée une fois avec du tampon 0,01 M et une ébullition de 15 min., puis 2 fois avec du tampon 0,001 M en faisant bouillir chaque fois 15 min. L'hydroxylapatite ainsi obtenue est conservée dans du tampon phosphate 0,001 M pH 6,8.

III. - Chromatographie dans des colonnes

1. Appareillage.

La colonne est constituée par un cylindre de verre de hauteur comprise entre 10 cm et 100 cm et d'un diamètre de 0,9 cm. Elle est terminée à son extrémité supérieure par un rodage conique mâle n° 2 et à son extrémité inférieure par une plaque de verre fritté de porosité 1. La colonne est enveloppée d'une jaquette également en verre, à l'intérieur de laquelle une pompe fait circuler un liquide réfrigérant à la température de 1° C.

L'appareil de gradient comprend deux parties situées l'une au-dessus de l'autre : la chambre de mélange et la chambre de réserve. Ces 2 chambres sont reliées par un tube capillaire en verre épais. La chambre inférieure ou chambre de mélange repose sur un agitateur magnétique qui maintient une bonne agitation. Le centre de cette chambre est relié directement au

sommet de la colonne par l'intermédiaire d'un tuyau en polyéthylène.

Le collecteur destiné à recueillir les diverses fractions de l'éluat est enfermé dans une caisse isotherme. Cette caisse est maintenue à la température de 2 à 3° C grâce à la circulation d'une saumure provenant d'un bain froid.

2. Préparation de l'adsorbant.

L'échangeur doit être soigneusement équilibré avec le tampon d'adsorption : (*a*) DEAE-cellulose : On mélange 10 g d'adsorbant et 1 l de tampon, on agite et on place la suspension sous les électrodes d'un pH-mètre. On ajuste le pH en ajoutant de l'acide phosphorique dilué jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. On lave ensuite pendant 2 jours par décantation en renouvelant le tampon deux fois par jour. (*b*) CM-cellulose : La CM-cellulose (10 g/l) est équilibrée avec le tampon d'adsorption pendant 48 h sous agitation. On vérifie finalement que le pH de la suspension est égal à celui du tampon d'équilibrage.

3. Remplissage de la colonne.

On place à l'intérieur de la colonne sur le disque en verre fritté une rondelle de papier filtre de même diamètre ou mieux de la laine de verre. On laisse décanter partiellement la suspension et on la verse doucement dans la colonne afin d'éviter d'introduire des bulles d'air. L'adsorbant sédimente tandis que le tampon s'écoule par le bas de la colonne. On ajoute à nouveau de la suspension afin d'obtenir la hauteur voulue. Lorsque cette hauteur est constante, on place sur la surface de l'adsorbant une rondelle de papier filtre identique à la première afin que cette surface reste plane pendant la durée de l'expérience. Cette surface doit d'autre part toujours être recouverte de tampon. On finit de tasser la colonne avec de l'air comprimé. On lave pendant une nuit avec le même tampon d'équilibrage. La colonne est prête à recevoir la solution étudiée.

4. Caractéristique de la colonne.

La colonne est caractérisée par ses dimensions (diamètre et hauteur) et par son volume mort qui est pratiquement l'unité d'élution. Le volume mort (V.M.) est égal au volume de la phase mobile de la colonne. On le détermine en faisant traverser la colonne par un corps non adsorbé dans les conditions de l'expérience (colorant, sel ou protéine). Pour un adsorbant donné, le volume mort est fonction de nombreux facteurs : dimensions des grains, degré de tassement, pH, force ionique, nature du tampon, température, etc. Le débit est également une caractéristique importante de l'opération. On le règle soit en appliquant une certaine pression d'air en haut de la colonne, soit en faisant arriver le tampon d'une certaine hauteur. Enfin, la charge ou

quantité de corps destinée à être chromatographiée doit être mentionnée. Elle est déterminée en fonction des capacités d'adsorption de l'échangeur. Les dérivés de la cellulose ont un très grand pouvoir adsorbant, ils adsorbent dans certaines conditions leur poids de protéine.

Dans le cas de la chromatographie d'équilibre, le volume de la charge ne doit pas dépasser une certaine limite afin d'avoir une bande de départ aussi fine que possible.

5. Chargement de la colonne.

On attend que le niveau du tampon d'équilibrage soit tangent à la surface de la colonne et on laisse couler doucement le long de la paroi la solution enzymatique à l'aide d'une pipette recourbée. Lorsque la charge a pénétré dans la colonne, on lave 2 fois les parois de la même façon avec quelques ml de tampon.

6. Elution.

Nous avons pratiqué 3 types d'élution : (*a*) L'élution par le tampon d'équilibrage. C'est le cas de la chromatographie d'équilibre. (*b*) L'élution discontinue : Les protéines sont adsorbées au sommet de la colonne et se décrochent lorsqu'on fait varier brusquement le pH ou la force ionique de l'éluant. On lave la colonne par l'éluant de façon à décrocher une première fraction de protéines. Lorsque cette fraction est complètement éluée, on change le liquide d'élution, ce qui a pour effet de décrocher une deuxième fraction et ainsi de suite. (*c*) L'élution par gradient : Dans ce cas il n'y a plus de variations brusques mais un changement progressif soit du pH, soit de la force ionique, soit de ces deux facteurs à la fois. En effet, toutes les fois qu'une goutte de liquide entre dans la colonne, une goutte de la chambre de réserve pénètre dans la chambre de mélange et change la composition du liquide. Ces variations progressives sont illustrées par la courbe de gradient. Nous n'avons utilisé ici qu'un gradient linéaire, ce qui exige avec l'appareillage utilisé que le volume de la chambre de mélange soit bien supérieur à celui du liquide traversant la colonne pendant l'expérience.

$$K = \frac{\text{volume d'éluat}}{\text{volume chambre de mélange}} \ll 1$$

Le volume de notre chambre de mélange a été uniformément de 560 ml.

IV. - Récolte du suc pancréatique (cas du porc)

1. Technique de fistulation.

L'établissement d'une fistule pancréatique permanente chez le bœuf paraît maintenant au point aux U.S.A. Mais le porc est un animal extrêmement fragile du point de vue opératoire.

Aucun chirurgien ou vétérinaire n'avait jusqu'ici tenté l'opération sur cet animal. Or, nous désirions obtenir spécifiquement du suc pancréatique de porc, puisque ce suc est particulièrement riche en lipase et que tout notre travail antérieur avait été réalisé avec de la pancréatine de porc. Nous nous sommes donc adressés à M. le Professeur Marcenac, Directeur du Centre de Chirurgie Expérimentale de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, lequel écrivait à l'époque : « La réalisation d'une fistule pancréatique en vue de l'obtention de suc ne donne pas satisfaction par les techniques classiques (Heindenhein, Pawlow) : troubles de la sécrétion en quantité et qualité dus au choc chirurgical, difficulté de récolte, impossibilité de survie suffisante du donneur n'autorisant des recherches que sur des prélèvements médiocres en volumes ».

Précisons l'origine des troubles de la sécrétion : au moment de l'opération, le porc est à jeun depuis 48 h. Avant même de subir l'opération, il possède une sécrétion déficiente que le choc opératoire rend anormale. Le déroutage de ce suc mal défini a pour effet d'empêcher l'animal de digérer, ce phénomène contribue à l'appauvrissement du suc et le rend d'autant moins valable comme source enzymatique.

Malgré toutes ces difficultés, l'opération a été réussie avec une grande habileté par le Professeur Marcenac et son assistant le Docteur Leroy.

Le principe de cette technique originale de fistulation est le suivant : une première sonde est enfoncée dans le canal pancréatique tandis qu'une autre sonde est introduite dans le duodénum. Ces deux sondes peuvent être connectées, en dehors des périodes de collection pour permettre au suc pancréatique de s'écouler dans l'intestin. L'animal de choix est un porc de 65 kg environ. Il doit être en très bonne santé et préparé depuis un mois. Il doit avoir un régime alimentaire normal qui n'est pas celui des porcs de boucherie, lesquels sont engraissés. 48 h avant l'opération le porc doit être laissé à jeun. L'anesthésie est faite au pentothal (injection intraveineuse permanente). L'intervention chirurgicale peut alors commencer. Pratiquer une laparatomie médiane, rechercher le pancréas et, en évitant la duodenotomie, repérer par l'extérieur le canal de Santorini. Passer une sonde en polyéthylène de calibre adapté dans le canal, la fixer par une ligature dont la solidité est assurée par engagement des fils dans un anneau en plastique encerclant la sonde. Il importe en effet que la sonde soit solidement fixée pour éviter tout accident lors de la collection. Fixer la sonde pancréatique sur la paroi duodénale, fixation également renforcée par passage des fils dans 2 anneaux identiques au précédent. Faire sortir le cathéter, ou sonde pancréatique, par perforation de la tunique abdominale, passer un deuxième tube en polyéthylène de calibre plus gros que le précédent dans un pertuis du duodénum 8 à

10 cm plus bas, l'enfoncer dans la lumière de cette anse intestinale en direction du jéjunum, l'autre extrémité du tube sortant par une perforation de la paroi abdominale un peu en arrière de la précédente. Pour rendre l'ensemble du dispositif solidaire et de solidité aussi complète que possible, pratiquer une duodenopexie à la paroi abdominale et, par mesure de sécurité, faire faire aux 2 sondes un trajet sous-cutané avant de les extérioriser. Connecter les 2 sondes (sonde pancréatique, sonde intestinale de retour).

2. Collection.

L'animal est réchauffé. Le laisser reposer entre 2 et 4 jours jusqu'à ce qu'il ait repris une vie normale. C'est alors seulement que les prélèvements peuvent commencer. Nous avons fait ces prélèvements 2 fois par jour pendant 2 heures chaque fois, et en période digestive. Au début de la collection, on s'est assuré que l'animal mangeait depuis au moins 1 heure. Le débit théorique de la sécrétion pancréatique chez le porc est de 0,3 ml/kg/h, ce qui, pour un porc de 70 kg, représente 21 ml à l'heure et 500 ml environ par jour. Pour notre part, nous avons constaté un débit bien supérieur, de 40 à 75 ml à l'heure. Cette sécrétion excessive est peut-être due au fait que nous avons collecté en période de digestion qui doit sans nul doute coïncider avec la sécrétion maxima, ou à une excitation permanente due à la sonde. Pour qu'une collection aussi longue soit possible, nous avons construit une cage dont l'une des parois latérales était mobile et pouvait ainsi servir à bloquer l'animal. L'animal une fois bloqué, on enlève son pansement, on déconnecte les sondes en évitant de tirer dessus. La sonde de retour est fermée par une pince, tandis que le suc pancréatique se déverse dans un récipient entouré de glace, par l'intermédiaire d'une rallonge fixée à la sonde.

La sécrétion se fait par à-coups. On recueille un liquide clair avec parfois quelques fibres blanches. A la fin de la collection, on ouvre la sonde de retour, on enlève la rallonge de la sonde pancréatique, on réunit les deux sondes, on les attache solidement l'une à l'autre, on refait le pansement et grâce au système de paroi mobile, on libère le porc de son inconfortable position.

La collection sitôt terminée, le suc est congelé en attendant d'être lyophilisé. Il se lyophilise très bien et se garde sous cette forme au conservateur à —20° C pendant plusieurs semaines.

CHAPITRE III

ESSAIS DE PURIFICATION DE LA LIPASE PAR DES TECHNIQUES CONVENTIONNELLES ET A PARTIR DU PANCREAS

I. - Introduction

L'étude des substances élaborées par le pancréas se fait généralement à partir de la glande totale. Il est en effet plus facile de se procurer à l'abattoir des pancréas d'une espèce donnée, que de placer une fistule sur un animal vivant et de recueillir le suc. Cependant, comme il sera répété plus loin, le mélange des protéines contenues dans le suc est généralement plus simple que celui extrait de la glande entière. La purification d'un enzyme donné, à partir du suc, est donc vraisemblablement plus aisée dans bien des cas.

La plupart des auteurs ont utilisé la pancréatine comme source de lipase tandis que les enzymes protéolytiques sont directement extraits à partir du pancréas (extraction sulfurique 0,25 N). La pancréatine présente a priori quelques avantages. En particulier, l'eau et les constituants lipidiques ont été éliminés par l'acétone et l'éther, ce qui donne à la pancréatine une bonne stabilité. En outre, les parois cellulaires ont été modifiées par les solvants et les enzymes passent facilement en solution aqueuse.

Nous avons donc entrepris la purification de la lipase à partir de la pancréatine avant d'étudier son extraction à partir du pancréas brut.

II. - Purification à partir de la pancréatine

Les essais de purification de la lipase de porc, par des techniques conventionnelles, ont été réalisés dans le but de fournir à des techniques de fractionnement plus sélectives (chromatographie, électrophorèse), une matière première enrichie et stable. Nous allons étudier successivement : la préparation de la pancréatine, l'extraction de la lipase, la précipitation fractionnée par les sels neutres et les solvants organiques, le chauffage, les fractionnements éventuels par variation du pH et de la force ionique et enfin l'adsorption sélective de la lipase sur divers gels et sur des émulsions de triglycérides.

1. Préparation de la pancréatine.

La méthode originale de Willstätter (1) a été tout d'abord améliorée. Des résultats satisfaisants et reproductibles ne peuvent être obtenus sans un contrôle précis de tous les facteurs provoquant soit l'inactivation partielle de l'enzyme, soit une modification des autres protéines.

Les pancréas sont prélevés un quart d'heure après la mort de l'animal, immédiatement congelés et transportés dans cet état au laboratoire. Ils sont alors dégelés, coupés en morceaux et broyés dans un mixer à lames rotatives en présence d'acétone. Le temps de broyage est aussi court que possible pour éviter tout échauffement. Le broyat est agité mécaniquement avec de l'acétone (1 l. pour 500 g de pancréas) pendant 2 heures à la température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot subit un traitement identique d'abord dans 1 l. d'acétone puis dans 1 l. d'un mélange 50 : 50 d'acétone et d'éther et enfin 2 fois dans 1 l. d'éther. La masse obtenue est séchée sous vide, puis passée au tamis n° 100. On sépare ainsi la poudre qui est conservée et les fibres (1/3 du poids total) qui sont éliminées.

2. Extraction de la lipase.

Plusieurs études systématiques ont déjà été effectuées en vue de déterminer les meilleures conditions d'extraction de la lipase à partir de la pancréatine de porc. Mais leurs résultats sont si contradictoires, qu'il nous a paru nécessaire de soumettre ce problème à un nouvel examen. L'extraction de la lipase dépend de plusieurs facteurs : la nature du liquide d'extraction, la température, la durée de l'extraction, les proportions respectives de la pancréatine et du liquide d'extraction, le pH et la teneur en sels de ce liquide. Willstätter (1) extrait la lipase par une solution concentrée de glycérol en prétendant que ce solvant stabilisait l'enzyme. En fait, le glycérol est inutile et il gêne considérablement les purifications ultérieures. King et Glick (58) ont proposé une extraction à 37° par une solution de NaCl à 10 %. Cette technique n'améliore pas le rendement de l'extraction, à condition que la pancréatine soit bien dégraissée. La température élevée provoque une dénaturation de l'enzyme. L'extraction par $Mg\ SO_4$ 0,1 M préconisée par Boissonnas (59) n'est pas non plus nécessaire si la pancréatine est bien préparée. Enfin, contrairement aux indications de Herr et Sumner (60), une extraction alcaline ne présente aucun intérêt. Elle n'augmente pas la quantité de lipase extraite mais elle favorise la solubilisation d'autres protéines et d'une quantité considérable d'acides nucléiques.

La technique suivante nous semble la meilleure : la pancréatine (10 g) est extraite à 0° par 60 ml d'eau, pendant 15 min. sous agitation. La suspension est centrifugée pendant 10 min. (*)

* Toutes les centrifugations sont faites dans un champ centrifuge d'environ 15 000 g à 0° C (solution aqueuse) ou à — 12° C (mélanges eau-acétone).

et le culot est lavé 2 fois par 20 ml d'eau. Les extraits réunis (E_1) sont limpides et légèrement jaunâtres. Les substances dissoutes représentent à peu près 60 % du poids initial de la pancréatine. On y trouve 40 000 unités lipase, c'est-à-dire la majeure partie de l'activité mesurable de la pancréatine. L'activité spécifique est de 50-60. Ces extraits sont très instables à cause de leur teneur élevée en enzymes protéolytiques. Ils doivent donc être immédiatement purifiés.

3. Précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium.

L'extrait E_1 étant très complexe, nous avons placé en tête de notre schéma de purification une précipitation par le SO_4Am_2. Cette opération commode permet d'éliminer toutes les matières non protéiques contenues dans E_1, en particulier les acides nucléiques. D'autre part, la lipase est beaucoup plus stable après précipitation à l'aide de ce sel.

Nous avons tracé la courbe de précipitation de la lipase et des protéines pour diverses concentrations en SO_4Am_2. Cette courbe (fig. 4) est très utile car elle permet d'étudier avec précision les diverses étapes de la purification et de choisir l'intervalle de précipitation le plus favorable, compte tenu du taux de purification et du rendement.

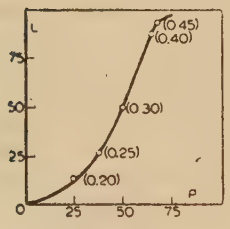


Fig. 4

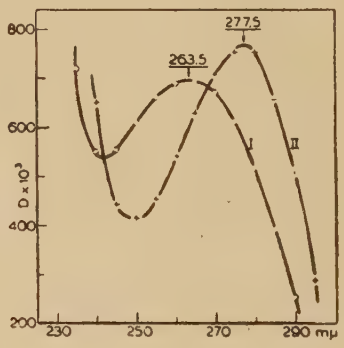


Fig. 5

Fig. 4. — *Courbe de précipitation de la lipase par le sulfate d'ammonium.*

P et L sont, respectivement, les pourcentages de protéines totales (déterminées par la technique colorimétrique de Lowry) et les pourcentages de lipase (déterminée par le test d'activité) précipités pour chaque concentration en sulfate d'ammonium. Les chiffres entre parenthèses expriment cette concentration de la façon conventionnelle, c'est-à-dire en fraction de saturation.

Fig. 5. — *Spectres d'absorption à 280 mμ de l'extrait E_1 et de la solution du culot C_2.*

Courbe I : extrait E_1 à 1 p. 100 (dilution 1/20). Courbe II : solution du culot C_2 dans un volume égal au volume initial de E_1 (dilution 1/5).

Se comportant comme une globuline, la lipase est précipitée par SO_4Am_2 0,5 S. Les albumines restent en solution et sont ainsi éliminées. Etudions la région 0,0-0,5 S. Dans notre mode de représentation, plus la pente de la courbe est grande, plus le taux de purification est élevé dans la région considérée. On voit ainsi que la lipase se trouve parmi les globulines les plus solubles. La meilleure purification est obtenue dans l'intervalle 0,25-0,45 S. Mais, afin d'améliorer le rendement global de l'opération, la solution du culot 0,25 S (C'_1) est à nouveau précipitée à 0,25 S. Les deux liquides surnageants (S_1) et (S_2) sont alors réunis et précipités à 0,45 S, ce qui a pour effet de précipiter un culot C_2 contenant 90 % de la lipase de l'extrait E_1. Son activité spécifique est 100-110, soit à peu près le double de celle de l'extrait initial. L'augmentation de l'activité spécifique traduit d'ailleurs assez imparfaitement l'efficacité du traitement, lequel permet également d'éliminer les matières non protéiques qui représentent 40 à 45 % de l'extrait E_1. Dans la figure 5, on peut comparer les spectres de E_1 et de la solution de C_2. On voit que la précipitation déplace le maximum d'absorption de 2 635 à 2 775 A°. Le culot C_2 ne contient donc pratiquement plus d'acides nucléiques. Les culots C_2 peuvent être conservés à 0° pendant plus d'une semaine sans baisse d'activité. Voici la technique opératoire : l'extrait aqueux E_1 (85-90 ml) est additionné de son volume d'une solution saturée de SO_4Am_2 (solution saturée à 20° C). Après 15 min. le mélange est centrifugé pendant 5 min. et le culot est lavé par 90 ml de SO_4Am_2 0,5 S. Ce culot est dissous dans un volume de tampon TRIS 0,1 M pH 8 égal au volume initial et la solution limpide est additionnée à nouveau de SO_4Am_2 saturé jusqu'à la concentration désirée. L'addition se fait goutte à goutte sous une bonne agitation mécanique. On laisse équilibrer 15 min. avant centrifugation.

4. Précipitations fractionnées par les solvants.

a) *Acétone.*

(1) En l'absence d'ions Ca++. L'acétone s'est révélée un excellent agent de précipitation de la lipase, en particulier de la lipase du C_2. Par suite vraisemblablement d'interactions entre les protéines avec les acides nucléiques, la précipitation acétonique de E_1 est bien moins sélective. Nous avons tracé la courbe de précipitation de la lipase et des protéines pour diverses concentrations en acétone. L'examen de cette courbe (fig. 6) montre que plus de 90 % de la lipase ont précipité lorsque la concentration en acétone atteint 49 %. Du point O au point A, la courbe est presque linéaire. Le taux de purification est donc le même dans toute cette région. L'activité spécifique des fractions est de 280-300. A partir du point A, les protéines étrangères commencent à précipiter en masse, et l'activité spécifique de la fraction AB n'est plus que de 60. Nous sommes donc contraints

de nous arrêter à 46 % d'acétone et d'abandonner par conséquent environ 25 % de la lipase dans le surnageant. Le fractionnement 0-46 % nous fournit un culot (C_3) où la lipase est purifiée près de 3 fois par rapport au culot C_2 et 6 fois par rapport aux protéines de l'extrait E_1. Le rendement de l'opération est de 75-77 %.

On dissout le culot C_2 dans 100 ml d'eau (la concentration en protéines de la solution est de 1 %). On ajoute du sulfate d'ammonium pour amener la force ionique de cette solution à 0,6. On plonge la solution dans un bain froid à —12° C et on ajoute immédiatement de l'acétone également à —12° C. L'addition se fait goutte à goutte sous bonne agitation. L'addition d'acétone est réglée de façon que la concentration en solvant atteigne 46 % en 15 min. environ. On réduit alors l'agitation, on attend 25 min. et on centrifuge 5 min. à —12° C.

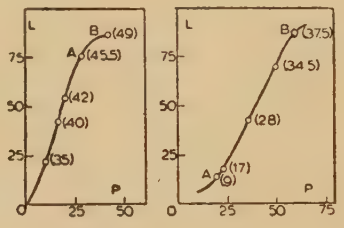


Fig. 6. — *Précipitation de la lipase par l'acétone.*

Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages d'acétone. Les autres conventions sont celles utilisées dans la fig. 4.

Fig. 7. — *Précipitation de la lipase par l'acétone en présence de calcium.*

Mêmes conventions que pour la fig. 6.

(2) En présence d'ions Ca++. Une nouvelle précipitation en présence de calcium a été étudiée. Le calcium a pour effet dans nos conditions de diminuer la solubilité de la lipase et de déplacer par conséquent la zone de sa précipitation par rapport à la précipitation des autres protéines. Cette diminution de solubilité suggère l'existence d'interactions entre l'enzyme et les ions Ca++. Ces interactions ne sont malheureusement pas l'apanage exclusif de la lipase. Le calcium favorise aussi la précipitation d'autres protéines et le degré de purification obtenu n'est pas aussi élevé qu'on aurait pu l'espérer. Néanmoins, si la lipase possédait malgré tout pour les ions Ca++ une affinité légèrement supérieure à celle des autres protéines, l'espoir subsisterait d'améliorer le caractère sélectif de la précipitation en abaissant la concentration de l'ion. Des expériences ont donc été faites à force ionique constante, en remplaçant peu à peu l'acétate de calcium fournisseur d'ions Ca++ par l'acétate de sodium. Aucune amélioration n'a été constatée. Les courbes de précipitation de la lipase et des autres protéines sont décalées en bloc et progressivement vers des concentrations d'acétone plus élevées.

Le baryum et le magnésium exercent un effet analogue à celui du calcium. La purification qu'ils permettent d'obtenir est toutefois un peu moins bonne. En présence de zinc ou de manganèse, d'autre part, la lipase et les protéines étrangères précipitent en bloc dès le début. C'est donc l'acétate de calcium à la concentration 0,05 M qui semble donner les meilleurs résultats.

Nous avons également fixé le pH à 7,6, la force ionique correspond à la concentration choisie en acétate de calcium. La courbe de précipitation (fig. 7) est alors en forme de S. On voit que la meilleure fraction se situe entre 10 et 37,5 % d'acétone (portion AB). On élimine donc des protéines moins solubles (culot 0-10 %) et des protéines plus solubles que la lipase (surnageant 37,5 %). On purifie la lipase environ 2 fois (activité spécifique 480-550) avec un rendement de 76 %.

Le culot C_3 est difficilement soluble en milieu neutre ou légèrement acide. On le met en suspension dans 30 ml d'eau à 0° et on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque 0,1 N pour aider la dissolution. Quand le pH de cette solution est abaissé à 6,3 par addition de CH_3COOH 0,1 N, il se forme un précipité abondant et relativement peu actif dont la séparation peut être envisagée. En fait, il est inutile d'éliminer ce précipité, la purification globale n'étant pas augmentée. On amène donc le pH à 7,6 et la concentration en acétate de calcium à 0,05 M. Le mode de précipitation est le même que précédemment. Le culot obtenu est appelé C_4.

Notons qu'une nouvelle précipitation par l'acétone de la solution du culot C_4 permet d'atteindre une activité spécifique supérieure. Cette précipitation se fait en l'absence d'ions calcium. La fraction qui précipite entre 25 et 40 % d'acétone contient 60 % de la lipase et possède une activité spécifique supérieure à 700. En pratique, on dissout le C_4 dans 15 ml d'une solution de Versène 0,1 M à pH 5,5 afin de désioniser le calcium. Après une incubation de 1 h à 0°, on effectue la précipitation comme à l'ordinaire en ajoutant de l'acétone à —12° C.

b) *Ethanol.*

Les précipitations par l'éthanol de E_1 et des solutions de C_2 ne donnent pas de bons résultats. Il faut en outre ajouter plus de 50 % d'éthanol pour obtenir la précipitation complète de la lipase, même au voisinage du point isoélectrique. Une telle concentration favorise la dénaturation de l'enzyme. Nous avons étudié également la précipitation éthanolique de la solution d'un C_3 pour divers pH. A pH 5, l'activité spécifique maximum atteinte est de 460 pour la fraction 14,5-25 %. La purification n'est donc pas supérieure à celle obtenue lors de la précipitation acétone-calcium, mais le rendement est bien moindre (27 %).

Par conséquent, contrairement à ce que pourraient suggérer les chiffres publiés par Herr et Sumner (60) l'usage de l'éthanol

ne semble pas présenter d'intérêt pour la purification de la lipase. Les précipitations par ce solvant sont moins sélectives qu'avec l'acétone. Les risques de dénaturation sont plus grands.

5. Autres techniques de précipitation fractionnée.

a) *Chauffage.*

La technique du chauffage, utilisée souvent en Enzymologie, repose sur le principe suivant : on chauffe avec précaution la solution impure d'enzymes dans des conditions de pH et de force ionique assurant une stabilité aussi bonne que possible de l'enzyme et une dénaturation aussi forte que possible des autres protéines. Une partie de ces dernières précipite alors et peut ainsi être séparée. La purification par chauffage de la lipase paraît a priori une gageure si l'on considère la faible stabilité de cet enzyme. En fait, l'instabilité de la lipase, au début de sa purification tout au moins est due surtout à la présence d'enzymes protéolytiques. Tous nos essais sont donc faits en milieu légèrement acide (pH 5-6) qui semble d'ailleurs augmenter la stabilité intrinsèque de la lipase. Le chauffage est une technique de fractionnement assez grossière. Aussi, l'avons-nous utilisée pour purifier une solution lipasique impure d'activité spécifique 100-110 (C_2). Nous avons fait varier systématiquement le pH, la force ionique, la température et la durée du chauffage. A force ionique très faible (solution lipasique dialysée contre de l'eau), la lipase est très instable. Elle s'inactive à pH 5 dès que la température dépasse 50° C. Nous avons alors essayé diverses méthodes en vue de la stabiliser. L'addition d'acétate de calcium (0,005 M) n'a aucun effet. Pensant à l'époque que le Tween était un substrat de la lipase et sachant que les enzymes sont stabilisés par la présence de ses substrats, nous avons également essayé cette substance. Le Tween n'a aucune action. Par contre, la lipase est très efficacement protégée par son véritable substrat, c'est-à-dire une émulsion de triglycérides. On peut alors la chauffer à 63° C pendant 2 min. sans perte d'activité. Malheureusement, les difficultés rencontrées ultérieurement pour séparer la lipase et l'émulsion, difficultés dues justement à l'affinité considérable de l'enzyme pour cette émulsion, rendent très aléatoire la mise en œuvre pratique d'une telle technique. Notons néanmoins qu'en l'absence de l'émulsion, en chauffant à 50° C pendant 2 min. à pH 5 et avec une force ionique de 0,3, le taux de purification est 1,4 avec un rendement de 100 %.

b) *Précipitation par variation du pH.*

Divers auteurs ont prétendu que la lipase pouvait être purifiée en séparant le précipité qui se forme quand on acidifie les extraits bruts de pancréatine. Le précipité obtenu en acidifiant l'extrait E_1 à pH 4,4 contient effectivement 80 % de la lipase. Mais, la précipitation n'a aucun caractère sélectif. Tous

les précipités obtenus à pH 5,2, 4,75 et 4,4 possèdent à peu près la même activité spécifique que l'extrait initial. Ce résultat n'est d'ailleurs pas surprenant. La lipase ne précipite plus en milieu acide dès que les premiers stades de la purification ont été franchis. Dans les extraits E_1, ce sont vraisemblablement les acides nucléiques qui, précipitant eux-mêmes, entraînent la lipase de façon non sélective.

Notons cependant qu'une solution de C_3 dépourvue d'acides nucléiques donne un léger précipité à pH 6,2. Le surnageant contient 90 % de la lipase avec une activité spécifique de 400-500. On opère comme suit : le culot C_3 est entièrement dissous par addition de quelques gouttes d'ammoniaque 0,1 N. Puis, en s'aidant d'un pH-mètre, on abaisse le pH à 6,2 avec de l'acide acétique 0,1 N. On laisse équilibrer 15 minutes à 0° C et on centrifuge.

c) *Précipitation par abaissement de force ionique.*

Nous avons essayé sur la foi de certains travaux de précipiter la lipase par dilution de ses solutions ou par dialyse contre de l'eau au voisinage de son point isoélectrique (pH 5-6). Les solutions de C_2, C_3 et C_4 ne précipitent pas par dilution. Mais la solution de C_3 donne par dialyse à pH 4,5 un précipité peu actif. On dialyse pendant 30 h contre 500 ml de tampon acétate 0,02 M, le liquide extérieur étant changé 4 fois. 30 % de la lipase sont précipités. Mais la fraction de lipase qui reste dans le surnageant (70 %) possède une activité spécifique de 660, ce qui représente une purification de plus de deux fois par rapport au C_3. La dialyse du culot C_4 ne permet pas d'atteindre une activité spécifique supérieure. Par contre, la précipitation par l'acétone en présence de calcium, d'un C_3 dialysé permet d'atteindre une activité spécifique de 900-950, ce qui représente une purification de 20 fois par rapport aux protéines de l'extrait brut.

6. Techniques d'adsorption sélective.

a) *Sur un gel de phosphate tricalcique.*

D'après ce qui vient d'être dit, les techniques de précipitation fractionnée sont très efficaces au début. Puis, au fur et à mesure que l'état de pureté s'améliore, il devient difficile d'obtenir de nouveaux progrès. Nous avons donc étudié trois techniques d'adsorption sélective en partant de solutions de C_3, lesquelles représentent un stade bien défini dans le schéma général de purification.

Nous avons tout d'abord déterminé le comportement de la lipase vis-à-vis du phosphate tricalcique. On constate que l'adsorption de la lipase et la sélectivité de cette adsorption sont maximum quand le pH est 6 environ et quand la force ionique est la plus faible possible. C'est donc l'eau qui à ce stade des opérations est le meilleur solvant du C_3. On arrive ainsi à adsor-

ber toute la lipase alors que 30 % des protéines restent en solution. L'élution est recherchée par la méthode classique, c'est-à-dire par l'emploi de solutions de plus en plus concentrées de phosphate disodique. Nous avons tracé la courbe d'élution de la fig. 8 en utilisant les conventions des courbes de précipitation, c'est-à-dire en portant en ordonnées les % de lipase éluée et en abscisses, les % des protéines éluées. On voit que la zone la plus favorable de la concentration en phosphate est située entre 0,005 et 0,1 M. L'activité spécifique de la fraction correspondante est environ 3 fois plus grande que l'activité initiale. Mais le rendement en lipase n'est que de 28 %. Il vaut donc mieux recueillir toute la fraction éluée par le phosphate 0,02 M. On obtient ainsi un taux de purification de 2,5 fois avec un rendement de 60 %.

2 g de gel sont mélangés à 5 ml d'une solution de C_3 contenant 2 500 unités lipase (activité spécifique 275). Après 10 min. d'agitation à 0°, le mélange est centrifugé à faible vitesse (1 000 g) et le culot est lavé par un volume d'eau égal au volume initial. Le culot est remis en suspension dans 5 ml de phosphate disodique 0,02 M. La durée de l'élution est de 20 min. sous faible agitation. On centrifuge alors à grande vitesse.

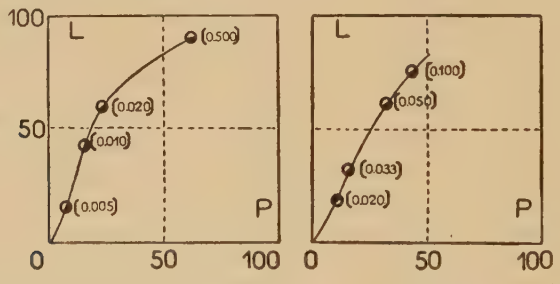


Fig. 8. — *Elution de la lipase adsorbée sur phosphate tricalcique.*

Les ordonnées représentent les pourcentages de lipase éluée et les abscisses les pourcentages de protéines éluées. Les nombres entre parenthèses indiquent la molarité du phosphate ayant provoqué l'élution de la fraction considérée.

Fig. 9. — *Traitement par le gel d'alumine* C_γ

Les ordonnées représentent les pourcentages de lipase restée dans le surnageant, et les abscisses, les protéines restées dans le surnageant. Les nombres entre parenthèses indiquent les molarités en acide citrique correspondant à l'opération considérée.

b) *Sur un gel d'alumine* C_γ.

Au cours de l'étude de l'adsorption sur gel d'alumine, nous avons remarqué (fig. 9) que : (*a*) les impuretés protéiques s'adsorbent préférentiellement à la lipase, (*b*) l'adsorption de la lipase et des protéines est plus élevée quand la force ionique est plus faible et (*c*) quand la force ionique est suffisamment élevée, la lipase n'est plus adsorbée, alors qu'une partie des autres pro-

téines continue de l'être. Le diagramme de la fig. 9 montre qu'en partant d'une solution de C_3 dans un tampon citrate 0,1 M en acide citrique à pH 5,5, 75 % de la lipase reste dans le surnageant accompagnée de 42,5 % des protéines totales. On réalise donc une purification de près de 2 fois par rapport au C_3.

Le culot C_3 est repris par 5 ml de tampon citrate 0,1 M pH 5,5. On ajoute à cette solution 2 g de gel d'alumine C_7. On agite à 0° pendant 10 min. et on centrifuge à grande vitesse (15 000 g).

Si l'on réalise successivement les deux adsorptions sélectives, les bénéfices des 2 opérations ne s'ajoutent pas intégralement. Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant d'abord le phosphate, puis l'alumine. Le traitement par le gel de phosphate permet d'atteindre une activité spécifique de 750. On précipite la solution par addition de SO_4Am_2 solide. On reprend le culot par 5 ml de tampon citrate et on procède à la 2e adsorption. On obtient ainsi une activité spécifique de 900-1 100.

c) *Sur une émulsion de triglycérides.*

Mise en présence d'une émulsion de triglycérides, la lipase abandonne la phase aqueuse et vient se fixer solidement à l'interface eau-huile. Elle regagne la phase aqueuse dès que l'émulsion casse. Les premiers essais d'adsorption ont été réalisés sur une solution de C_2 (61). L'adsorption sur les globules de triglycérides est maximum à pH 5,8. A ce pH, la vitesse de lipolyse est nulle. La totalité de la lipase est alors fixée à l'interface eau-triglycérides. 90 % des protéines restent dans la phase aqueuse. Par conséquent si, après après avoir éliminé par lavage les protéines restées dans la phase aqueuse, on parvient à refaire passer la lipase en solution, l'activité spécifique de celle-ci serait d'environ 1 000. Mais la difficulté pratique est précisément de récupérer la lipase après adsorption. Il n'est pas possible d'éluer la lipase par lavage de l'émulsion par des liquides de pH et de force ionique différents. Il faut donc casser l'émulsion. Trois moyens sont à notre disposition : la centrifugation à très haute vitesse, l'élimination de l'émulsifiant et l'extraction de la phase grasse par un solvant organique.

Nous avons utilisé divers types d'émulsions (avec ou sans émulsifiant). L'émulsion au rhodoviol HS 100 conviendrait le mieux car elle est assez stable pour subir les premiers lavages sans casser, et elle casse presque totalement lorsqu'on la centrifuge à très haute vitesse (140 000 g à la centrifugeuse préparative Spinco). On obtient alors 3 couches : une couche aqueuse, une couche d'huile et une couche intermédiaire blanchâtre constituée par la partie la plus fine de l'émulsion. La lipase se trouve malheureusement dans cette couche.

Nous avons pu alors casser totalement l'émulsion en précipitant le rhodoviol par SO_4Am_2 0,2 S. On obtient par centrifu-

gation 3 couches : une couche aqueuse, une couche d'huile et une lamelle élastique de rhodoviol. La lipase se trouve encore une fois dans cette couche intermédiaire. D'autre part, les émulsions stabilisées par les savons adsorbent beaucoup moins de lipase à surface égale que les émulsions à base de Rhodoviol. Nous n'avons pas pu casser totalement ces émulsions même en abaissant le pH à 4. Puisque nous étions gênés par l'émulsifiant, nous avons finalement tenté de nous en passer et de réaliser l'émulsion avec la seule aide des protéines de la solution de C_3. Cette émulsion est malheureusement très stable et l'adsorption de la lipase est encore moins spécifique.

C'est la 3^e solution (extraction du corps gras par un solvant) qui est la meilleure. Le principal danger est alors la dénaturation des protéines, 2 solvants ont été utilisés, l'oxyde d'éthyle sans peroxyde et l'acétone. Pour éviter la dénaturation, les extractions sont effectuées à froid. Mais la solubilité des corps gras dans les solvants diminue avec la température. L'éther présentant l'inconvénient d'être notablement soluble dans l'eau, nous avons essayé d'autres solvants organiques comme l'hexane ou le chloroforme. Nous n'avons jamais réussi à éviter une inactivation importante qui diminue beaucoup l'intérêt de l'opération.

7. Discussion et conclusions.

L'étude des techniques conventionnelles de fractionnement appliquées à la lipase nous a permis d'établir un schéma cohérent de purification de cet enzyme à partir de la pancréatine. Plusieurs facteurs nous ont guidé dans cette recherche : la stabilité de l'enzyme, le rendement, le taux de purification et l'efficacité plus ou moins grande des techniques ultérieures de purification (électrophorèse ou chromatographie).

Une part des difficultés rencontrées dans la purification de la lipase provient de la faible stabilité de cet enzyme. Il serait vain par conséquent de vouloir juxtaposer un trop grand nombre d'étapes dans la purification, car cela se ferait au détriment du rendement d'une part et de la stabilité ultérieure de l'enzyme d'autre part. Certaines opérations provoquent une baisse de stabilité de la lipase. Pour cette raison, nous avons dû abandonner notre premier schéma de purification qui comprenait : l'extraction, une double précipitation avec SO_4Am_2, une précipitation acétonique et une dialyse suivie d'une précipitation acétone-calcium. La préparation finalement obtenue avait une activité spécifique de 900-950. Mais elle était instable au cours de l'électrophorèse qui constitue l'étape finale de la purification. Cette instabilité est peut-être due à l'effet de dialyse (perte d'un ion protecteur) qui est déjà en elle-même une opération de longue durée. Pour des raisons de stabilité également, le schéma : extraction — double précipitation avec SO_4Am_2 — adsorption sur émulsion de triglycérides, n'a pas non plus été retenu. L'étape

du chauffage a été rejetée car le taux de purification est trop peu élevé. Il nous est apparu enfin que l'efficacité du fractionnement électrophorétique était sensiblement la même pour une solution de C_3 purifiée par variation de pH que pour une solution obtenue par une double précipitation acétonique (avec et sans calcium).

Aussi avons-nous retenu le schéma suivant : extraction — (E_1) — double précipitation avec SO_4Am_2 (C_2) — précipitation acétonique sans calcium (C_3) — précipité à pH 6,2 — adsorption sur gel de phosphate (C_4) — traitement par l'alumine $C\gamma$ (C_5).

La préparation lipasique (C_5) ainsi obtenue a une activité spécifique de 1 000-1 100. Après une électrophorèse de zone dans une colonne d'amidon à pH 5,25 pendant 44 heures, elle permet d'obtenir un pic homogène d'activité spécifique 3 600. Ce pic soumis à une nouvelle électrophorèse à pH 5,25 ou à pH 8 ne présente aucun caractère d'homogénéité. Il est également homogène au cours d'une chromatographie sur hydroxylapatite (62). Tout ce travail de purification préliminaire, résumé dans le tableau II, a donc permis d'obtenir par électrophorèse de zone une préparation de lipase qui présente les caractéristiques d'une préparation pure.

TABLEAU II

Schéma de purification de la lipase pancréatique de porc à partir de la pancréatine

Techniques	Activité spécifique de la fraction	Purification par rapport à l'extrait E_1	Rendement (p. 100)
Extraction de la pancréatine par l'eau (E_1)	50-60	—	100
Double précipitation par SO_4Am_2 (C_2)	100-120	2	70
Précipitation acétonique	300-350	7	55
Elimination des protéines insolubles à pH 6	450-500	10	50
Adsorption sur phosphate tricalcique	750-800	16	—
Traitement par l'alumine $C\gamma$	1 000-1 100	20	25
Electrophorèse de zone sur amidon à pH 5,25	3 600	72	20

III. - Essais effectués à partir du pancréas

Une étude préliminaire de la purification de la lipase à partir du pancréas méritait d'être entreprise car plusieurs questions restaient en suspens : (1) La lipase n'est-elle pas partiellement inactivée pendant la préparation de la pancréatine ? (2) La purification n'est-elle pas plus facile en partant du pancréas qu'en partant de la pancréatine ? (3) La lipase est-elle réellement localisée dans des « granules de zymogène » au sein des cellules pancréatiques ? (4) La lipase existe-t-elle réellement dans le pancréas sous une forme inactive (prolipase) comme l'ont prétendu certains auteurs ?

1. Activité lipasique du pancréas.

Dans un mixer refroidi, on broie 10 g de pancréas de porc dans 40 ml de tampon acétate pH 5,5. On obtient un liquide laiteux contenant 700 à 900 unités lipase pour 1 g de pancréas. En rapprochant cette valeur du nombre d'unités contenu dans 1 g de pancréatine (4 000), on voit qu'il n'y a pas de perte d'activité pendant la fabrication de la pancréatine.

En outre, si l'on centrifuge le broyat, la plus grande partie de l'activité reste dans le surnageant. L'activité spécifique de cet extrait ne dépasse pas 28, tandis que l'activité de l'extrait E_1 est de 50-60. Etant de plus instables, ces extraits ne semblent pas être une bonne matière première pour la purification de la lipase.

Suivant la technique utilisée par Amon (63) pour extraire la carboxypeptidase à partir du pancréas de bœuf, nous avons fait des exsudats de pancréas. Après avoir été gelés puis dégelés, les pancréas laissent exsuder un liquide dont la sortie peut être favorisée par une légère compression. Le rendement en lipase de l'opération n'est pas excellent. L'activité spécifique de l'exsudat ne dépasse pas 38.

2. La lipase est-elle dans des granules de zymogène ?

On a depuis longtemps émis l'hypothèse que les enzymes pancréatiques se trouvent, non pas à l'état libre dans le protoplasme cellulaire, mais localisés dans des granules. Hokin (42) a fait récemment une étude des granules du pancréas du chien. Cet auteur fait un homogénat de pancréas (une part de glande pour 4 parts de saccharose 0,25 M). Il broie ainsi les cellules sans détruire les éléments figurés de ces cellules, lesquels sont ensuite séparés par centrifugation. Le saccharose est là pour donner au liquide une densité déterminée qui doit favoriser la sélectivité de la sédimentation. A 600 g, on centrifuge au fond du tube les globules rouges. Au-dessus, se trouve une couche brunâtre de cellules provenant du tissu conjonctif, puis une mince couche rose représentant sans doute les noyaux cellulaires

et enfin une couche blanche. Le surnageant de cette centrifugation est centrifugé à nouveau 10 min. à 8 500 g. On obtient 3 couches : au fond du tube, une couche blanche (granules de zymogènes), suivie par une couche brune (mitochondries) et une dernière couche rose (microsomes).

Nous avons constaté que les éléments figurés des cellules du pancréas de porc centrifugent à des vitesses bien supérieures : les granules de zymogènes sédimentent seulement à 25 000 g.

La glande est collectée un quart d'heure après l'abattage et conservée à 4° C dans du sérum physiologique. On broie 1 g de pancréas dans 9 ml de saccharose 0,25 M à l'aide d'un homogénéiseur Potter-Elvehjem à froid. Le broyage s'effectue en deux fois une minute de façon à éviter tout échauffement. Malgré les précautions prises pendant la collecte et le broyage, l'activité lipasique ne sédimente pas totalement. Dans les meilleures conditions, on ne centrifuge que les 2/3 de l'activité lipasique.

N'ayant pas entrepris d'essais comparatifs avec du pancréas de chien, nous ne savons pas si la lipase de porc est réellement en partie dans le protoplasme et en partie dans des granules, ou si les granules du porc sont plus instables que les granules du chien.

Quoi qu'il en soit, les granules de porc passent en solution au-dessus de pH 7. L'activité spécifique de ces solutions est de 80-90. Elle est donc légèrement supérieure à celle de la pancréatine mais assez voisine de l'activité spécifique du suc pancréatique.

Les difficultés d'extraction étant sérieuses, nous n'avons pas entrepris de purification de la lipase à partir de ces solutions, estimant d'autre part que leur composition devait être analogue à celle du suc pancréatique.

3. La question de la prolipase.

Rosenheim (64) et plus récemment Woodhouse (65) ont prétendu qu'en diluant un extrait acide de pancréas, on trouvait dans le précipité une « prolipase », c'est-à-dire une substance inactive mais susceptible de manifester une activité lipasique après mélange avec de l'extrait bouilli ou du sérum. L'hypothèse a été avancée que la dilution séparerait une « apolipase » insoluble et une « colipase » soluble, laquelle se trouverait également dans le sérum.

L'existence réelle d'une colipase paraît a priori surprenante : au cours de la purification de la lipase, nous n'aurions jamais réussi à scinder le complexe apolipase-colipase, bien qu'il paraisse très instable. Cependant, la mise en évidence éventuelle d'une colipase, facilitant peut-être les associations de la lipase avec ses substrats insolubles, aurait une telle importance que nous avons repris les expériences de Woodhouse. Nous avons trouvé, comme

ce dernier, qu'en faisant agir de la « prolipase » sur une émulsion d'huile d'olive sans activateur ni tampon, le degré de lipolyse est presque nul. Par contre, si l'on ajoute, soit de l'extrait pancréatique bouilli, soit du sérum, le degré de lipolyse devient notable.

Toutefois, il est aisé de constater que : (1) Le précipité de « prolipase » de Woodhouse est actif dans les conditions de notre test et (2) nos solutions actives de lipase sont incapables d'hydrolyser les triglycérides dans les conditions préconisées par Woodhouse pour l'essai de sa prolipase. Le prétendu effet « activateur » de l'extrait bouilli et du sérum est donc, non pas de promouvoir l'action d'une substance inactive, mais bien de rendre possible l'action de l'enzyme actif, grâce sans doute à une meilleure émulsification et une meilleure stabilisation du pH.

Le seul intérêt de ces expériences est de montrer que l'activité lipasique du pancréas précipite quand on dilue les extraits. Une fois séché par l'acétone et l'éther, ce précipité peut être extrait comme la pancréatine. Il livre alors une solution contenant à peine 1/3 de l'activité initiale. Mais l'activité spécifique des solutions est 130-140.

CHAPITRE IV

LA CHROMATOGRAPHIE DE LA LIPASE PANCREATIQUE DE PORC

Nous avons rappelé dans le Chapitre I[er] que les techniques chromatographiques ont permis au cours de ces dernières années de purifier ou de vérifier l'homogénéité de nombreuses protéines, et en particulier de nombreux enzymes. Il n'est pas exagéré de dire qu'à l'heure actuelle la chromatographie est la technique la plus populaire de l'Enzymologie. Toutefois, le comportement chromatographique de la lipase n'est pas très favorable et c'est finalement l'électrophorèse de zone qui a permis d'obtenir au Laboratoire une lipase apparemment pure. Mais il n'est pas sans intérêt de décrire ci-dessous les essais assez complets que nous avons effectués, d'autant plus que ces essais nous ont apporté des renseignements utiles sur certaines propriétés de la lipase et nous ont permis de soumettre la lipase dite pure à un test efficace d'homogénéité.

I. - Essais préliminaires sur CM et DEAE-celluloses

1. Recherche des conditions d'une chromatographie d'équilibre.

On sait que la chromatographie d'équilibre exige que le phénomène d'adsorption soit réversible et qu'il existe par conséquent en tout point de la colonne un équilibre parfait entre l'adsorption et l'élution. Ce caractère de réversibilité est mis en évidence par des essais de rééquilibrage en tubes à essais (37). L'adsorbant, généralement à l'état de poudre 200-400 mailles, est équilibré avec le tampon d'adsorption dans un tube gradué. Après centrifugation, le tampon est remplacé par 2 ml d'une solution de protéines à 0,2 %. On amène le volume final à 5 ml avec du tampon. Le mélange est agité le temps nécessaire pour que l'équilibre soit atteint (environ 10 min.). On centrifuge. 2 ml de surnageant sont remplacés par 2 ml de tampon. On mélange à nouveau et on agite jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre soit atteint. Dans les 2 liquides surnageants, on dose la quantité d'enzyme non adsorbée M_1 et M'_1. On déduit par différence les quantités fixées (M_s et M'_s) et on calcule le coefficient de distribution de

la substance considérée entre les phases solide et liquide pour les 2 expériences :

$$C_d = \frac{M_s}{M_l} \times \frac{V_l}{V_s}$$

$$C'_d = \frac{M'_s}{M'_l} \times \frac{V_l}{V_s}$$

où V_l et V_s sont respectivement le volume de la phase liquide et le volume du solide sec. Quand l'adsorption est réversible, $C_d = C'_d$.

Mais nous nous sommes aperçus que de tels essais étaient dépourvus de signification quand la phase solide, à l'instar des dérivés de la cellulose, adsorbe par gonflement une quantité considérable de phase mobile et quand la substance étudiée, à l'instar de la lipase, doit sortir de la colonne après le passage de 5 volumes morts au maximum (*). Quand le solide gonfle, V_l/V_s doit être grand, faute de quoi la centrifugation ne fait sortir aucun liquide libre de la phase gonflée. Au cours de nos essais, nous utilisons 270 mg de CM-cellulose (soit 0,16 ml) pour un volume total de 5 ml, V_l/V_s est donc égal à 30,5. D'autre part, pour obtenir une migration rapide de la lipase, il faut que C_d soit de l'ordre de 2 ou 3. M_s/M_l ne doit donc pas dépasser 0,1. Autrement dit, la phase liquide dans laquelle la détermination de la lipase est faite, va contenir après adsorption et rééquilibrage $9/10^e$ de l'activité initiale. La détermination de M_s obtenue par différence de 2 nombres voisins, sera imprécise. Le test servant à la détermination de l'activité lipasique doit être considéré comme relativement précis puisqu'il fournit des résultats à $\pm$ 1 %. Néanmoins, un calcul simple d'erreur montre qu'il est impossible dans nos conditions expérimentales de savoir si C_d est resté constant au cours du rééquilibrage ou s'il a varié du simple au double. Cette discussion n'est pas sans intérêt car elle s'applique non seulement au cas particulier de la lipase, mais à la plupart des chromatographies utilisant un solide gonflant dans la phase mobile.

L'Amberlite XE-64 (250-400 mailles) ne présente pas ces inconvénients. Nous avons trouvé qu'en présence de tampon citrate 0,1 M pH 5,4, le coefficient de distribution de la lipase passe de 7 à 9 au cours du rééquilibrage.

2. Adsorption et élution de la lipase avec la CM-cellulose.

Les essais de rééquilibrage étant impossibles, nous avons

(*) Le pic d'élution des substances sortant de la colonne avec plus de 5 volumes morts est aplati, le fractionnement chromatographique devient mauvais.

cherché à trouver des conditions dans lesquelles la lipase s'adsorbe bien sur CM-cellulose et d'autres conditions dans lesquelles, une fois adsorbé, l'enzyme s'élue bien. L'élution est recherchée par une augmentation de la force ionique ou du pH. A faible force ionique (acétate 0,01 M), le degré d'adsorption dépend beaucoup du pH. Il varie en effet de 0 à près de 100 % dans un étroit domaine, encadrant le point isoélectrique de l'enzyme. La courbe de la fig. 10 possède d'ailleurs un point d'inflexion qui se situe très près du point isoélectrique de l'enzyme, soit 5,25. Quand on augmente la force ionique à pH constant (expériences à pH 5,35 dans l'acétate 0,02 et 0,15 M), le degré d'adsorption diminue considérablement, ce qui peut en principe laisser espérer un comportement chromatographique favorable.

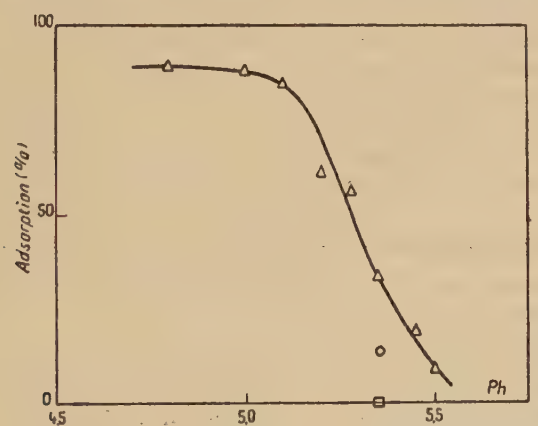


Fig. 10. — *Adsorption de la lipase par la carboxyméthylcellulose.*
Les essais sont réalisés dans les conditions décrites précédemment. Tampon acétate 0,01 M (△), 0,02 M (○) et 0,15 M (□).

On constate effectivement qu'après avoir adsorbé la lipase à pH 5,0 dans l'acétate 0,01 M, l'enzyme se laisse éluer en quasi totalité par NaCl 0,2 M dans le même tampon. Le taux de purification est de 1,6 fois.

3. Essais avec la DEAE-cellulose.

Le point isoélectrique de la lipase étant aux environs de 5,25, on peut penser qu'une protéine si fortement anionique va bien se chromatographier sur les échangeurs d'anions. L'adsorption doit alors se faire à un pH légèrement supérieur à 5,3 et à faible force ionique. L'élution doit être recherchée, soit par une augmentation de la force ionique, soit par une baisse du pH au-dessous du point isoélectrique de l'enzyme, soit au contraire par une élévation du pH afin de désioniser l'adsorbant.

250 à 300 mg de DEAE-cellulose (pK = 9,4, 0,577 milliéq. par g) sont équilibrés avec le tampon et additionnés de 2 ml

(500-600 unités lipase ; activité spécifique : 300) d'une solution de C_3 dans le tampon. Après avoir amené le volume total à 5 ml avec du tampon, on agite pendant 10 min. à 0° et on centrifuge. On dose la lipase et les protéines totales dans le surnageant. Une série d'expériences effectuées dans ces conditions ont montré qu'entre pH 5,5 et 7,4, la lipase s'adsorbe partiellement sur la DEAE-cellulose dans des tampons acétate, citrate, phosphate ou Tris (0,1 M ou 0,01 M) ; le degré d'adsorption est, conformément à l'attente, d'autant plus grand que le pH est plus élevé. Mais l'adsorption est loin d'être nulle (20-35 p. 100) à pH 5,0 et 4,5, c'est-à-dire au-dessous du point isoélectrique de l'enzyme. Ce fait suggère que l'échange d'ions n'est pas seul en cause dans les interactions entre la lipase et la DEAE-cellulose. Les difficultés considérables rencontrées au moment de l'élution le confirment amplement. Une fois adsorbée, la lipase ne se laisse pas éluer quand on lave l'adsorbant par un tampon plus concentré (phosphate 0,5 M pH 7,3 par exemple) ou même par un tampon acide (acétate pH 4,5) contenant NaCl à la concentration 0,6 M. Par contre, CO_3Na_2 0,3 M permet d'éluer la majeure partie de la lipase en désionisant vraisemblablement l'adsorbant.

II. - Chromatographie de la lipase dans diverses colonnes

1. Chromatographie dans des colonnes de CM-cellulose et d'Amberlite IRC-50.

a) *Chromatographie d'équilibre.*

L'élution de la lipase est trop aléatoire pour qu'on puisse avoir l'ambition de réunir à son sujet toutes les conditions d'une véritable chromatographie d'équilibre. Néanmoins, nos essais de rééquilibrage nous ont permis de délimiter la zone de pH et de force ionique la plus favorable pour ce type de chromatographie. La fig. 11 reproduit 4 diagrammes de chromatographie de la lipase sur CM-cellulose dans des systèmes de composition constante.

Les résultats de ces essais paraissent à première vue satisfaisants. Dans tous les cas nous avons réussi à éluer la lipase avec un rendement de l'ordre de 80-90 p. 100 et à séparer très nettement un pic important de protéines et un pic assez bien formé contenant la majeure partie de la lipase. 40 à 45 p. 100 des protéines restent fixées sur la colonne. Mais certaines anomalies diminuent un peu l'intérêt de l'opération. On constate tout d'abord que la lipase migre d'autant plus vite que le débit est plus lent. Ce fait est dû vraisemblablement aux difficultés déjà signalées qu'éprouve la lipase à s'éluer. On se rapprocherait sans doute des conditions d'équilibre en diminuant encore le débit de la colonne, mais on se heurterait alors aux inconvénients des expériences de longue durée. D'autre part, le fait de trouver dans tous les diagrammes au moins 2 pics doués d'activité lipa-

sique, ne signifie pas forcément qu'il existe plus d'une lipase dans le pancréas de porc. A défaut d'expériences plus précises, notons en effet que les proportions relatives des pics actifs varient sensiblement selon les conditions de la chromatographie et que l'électrophorèse de zone, laquelle permet pourtant un fractionnement beaucoup plus poussé des protéines du C_3, n'a jamais fourni qu'un seul pic actif de lipase. La meilleure hypothèse est donc que la formation de plusieurs pics actifs pendant la chromatographie sur CM-cellulose est un phénomène fortuit causé vraisemblablement par certaines irrégularités de l'élution.

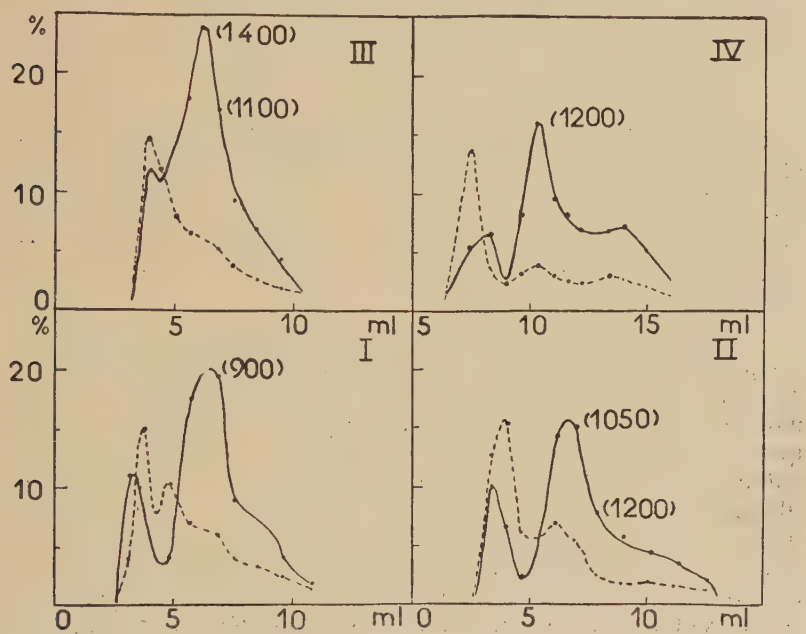


Fig. 11. — *Chromatographie de la lipase sur CM-cellulose dans divers systèmes de composition constante.*

Diagramme I : Colonne de 0,9 × 8 cm. Volume mort : 2,4 ml. Tampon acétate M/15 pH 5,4. Débit : 3,5 ml/h. Charge 0,5 ml d'une solution contenant 456 unités lipase d'activité spécifique 276. Rendement d'élution : 80 p. 100.

Diagramme II : Colonne de 0,9 × 8 cm. Tampon acétate M/15 pH 5,35. Débit : 3,5 ml/h. Charge : 0,5 ml d'une solution contenant 532 unités lipase d'activité spécifique 400. Rendement : 80 p. 100.

Diagramme III : Colonne 0,9 × 8 cm. Tampon acétate 0,1 M pH 5,2. Débit : 2 ml/h. Charge : 0,5 ml d'une solution contenant 444 unités lipase d'activité spécifique 354. Rendement : 80 p. 100.

Diagramme IV : Colonne 0,9 × 16 cm. Tampon acétate 0,1 M pH 5,32. Débit : 1 ml/h. Charge : 0,5 ml d'une solution contenant 413 unités d'activité spécifique 330. Rendement : 90 p. 100.

Trait plein : activité lipasique. Trait pointillé : protéines totales. Les nombres entre parenthèses indiquent l'activité spécifique des fractions les plus pures.

Enfin, dès que l'on essaie d'améliorer les performances de la chromatographie en augmentant la hauteur de la colonne, le pic principal s'élargit et le rendement diminue.

Nous avons également chromatographié la lipase dans des colonnes d'Amberlite IRC-50 dans les conditions trouvées lors des essais préliminaires. La résine est équilibrée à pH 5,5 avec du tampon citrate 0,1 M en acide citrique. La hauteur de la colonne est de 9 cm. L'activité spécifique de la solution placée dans la colonne est 440. Le pic d'élution est bien formé. Son activité spécifique atteint 720. Mais le rendement d'élution ne dépasse pas 65 p. 100.

b) *Choromatographie dans des systèmes de composition variable.*

Les essais de chromatographie d'équilibre ne nous ont pas permis d'atteindre une activité spécifique et un rendement aussi élevé que par électrophorèse (62). Aussi avons-nous poursuivi nos essais en étudiant le comportement de la lipase dans des systèmes chromatographiques de composition variable. Nous nous sommes placés dans les conditions déterminées lors de l'étude préliminaire en tube.

Nous avons réalisé une série de chromatographies basées sur les principes suivants : équilibrage de la CM-cellulose dans une zone de pH comprise entre 5,0 et 5,3 ; adsorption de la lipase dans les mêmes conditions et élution par une augmentation brusque ou progressive de la force ionique ou du pH. Les résultats obtenus en éluant brusquement la colonne par le tampon d'équilibrage contenant NaCl à la concentration 0,2 M ou 1,0 M sont mauvais. La majorité des protéines sont éluées tandis que la lipase n'est récupérée qu'à concurrence de 5-25 p. 100. Cet échec est causé, tout au moins en partie, par un phénomène qui, malgré son caractère évident, ne semble pas avoir encore été signalé de façon explicite : l'existence d'un front acide très intense quand on fait traverser une colonne de CM-cellulose par un gradient abrupt de force ionique. L'effet d'élution est alors contrarié par l'abaissement du pH. Certaines protéines sensibles (comme la lipase) peuvent même être désactivées par l'acidité excessive qui se développe.

Quand, au lieu d'augmenter d'un seul coup la force ionique, on établit un gradient de concentration en NaCl ou en acétate, la baisse de pH devient évidemment moins sensible. Elle devient même négligeable quand le gradient est assez lent. Mais l'élution de la lipase se fait alors avec un mauvais rendement et le pic qui la contient est très étalé. En d'autres termes, il ne paraît pas possible de réaliser une purification satisfaisante de la lipase pancréatique de porc en la chromatographiant sur CM-cellulose dans un gradient de force ionique.

Des essais ont alors été entrepris à force ionique constante en augmentant progressivement le pH du liquide d'élution. La fig. 12 indique la forme de l'un des gradients de pH utilisés. La courbe de la fig. 12 montre que, dans l'expérience en question, on obtient un gradient concave très régulier. La lipase sort entre pH 5,2 et pH 5,6. Mais le rendement n'excède pas 50 p. 100 et le taux de purification est peu élevé. Les résultats obtenus dans des colonnes sont donc beaucoup moins bons qu'on aurait pu l'espérer d'après les expériences préliminaires. Tout semble se passer comme si la lipase avait tendance à s'adsorber irréversiblement sur la phase solide. Il est vraisemblable que cette tendance se remarque davantage pendant les essais de chromatographie dans des colonnes que pendant les expériences préliminaires, parce que le rapport : poids d'adsorbant/nombre d'unités enzymatiques est plus grand dans le 2e cas.

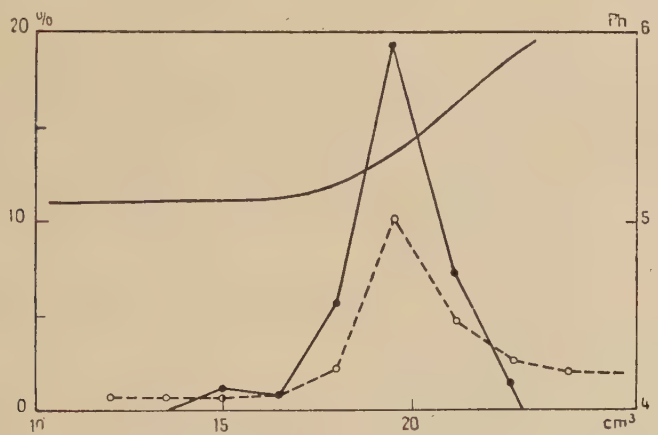


Fig. 12. — *Elution de la lipase adsorbée sur CM-cellulose par variation de pH à force ionique constante.*

Colonne 0,9 × 8 cm de CM-cellulose équilibrée avec du tampon acétate pH 5,1, force ionique 0,0375. Elution par de l'acétate de même force ionique. Débit : 6 ml/h. Mêmes conventions d'écriture qu'à la fig. 10.

2. Chromatographie dans des colonnes de DEAE-cellulose.

Les renseignements obtenus lors de l'étude préliminaire montrent qu'il est préférable de chromatographier la lipase sur cellulose basique à pH neutre ou légèrement basique.

Le diagramme de la fig. 13 montre qu'à pH 5,5 et à faible force ionique, 50 p. 100 des protéines sortent avec le premier volume mort. Ces protéines entraînent environ 15 p. 100 de la lipase. L'élution proprement dite est réalisée par CO_3Na_2 0,5 M. Aux environs de pH 9, un 2e pic émerge contenant 35 p. 100 de la lipase et 14 p. 100 des protéines. La fraction la plus pure

possède une activité spécifique d'environ 800 (purification de 2,5 fois). Mais le rendement global de l'élution est faible.

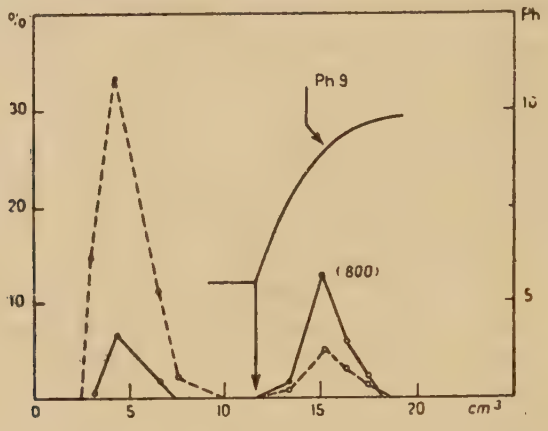


FIG. 13. — *Essai de chromatographie sur DEAE-cellulose.*

La colonne (0,9 × 8 cm) est équilibrée avec du citrate 0,1 M pH 5,5. Charge : 400 unités d'activité spécifique 310. Le volume mort de la colonne est 2,2 ml. Lavage de la colonne par CO_3Na_2 0,5 M.

o———o : Pourcentage de la quantité totale de lipase par ml d'éluat.

o------o : Pourcentage de la quantité totale de protéines par ml d'éluat.

———— Trait plein : variation de pH due à l'arrivée du carbonate. Le nombre entre parenthèses indique l'activité spécifique de la fraction la plus pure.

III. - Chromatographie sur différents phosphates de calcium

1. PHOSPHATE TRICALCIQUE.

Les essais préliminaires en tube ont été décrits au chapitre III. L'adsorption sur phosphate est suffisamment sélective pour constituer une étape de notre schéma de purification. On pouvait donc espérer un comportement chromatographique favorable avec cet adsorbant. Les essais de chromatographie dans des colonnes de phosphate tricalcique selon Swingle et Tiselius (66) n'ont cependant pas donné les résultats attendus. Le lavage de la colonne avec NaCl 1 p. 100 entraîne bien, comme les essais préliminaires le laissent prévoir, environ 30 à 40 p. 100 des impuretés protéiques. Mais l'élution de la lipase est très difficile, même avec une solution saturée à 0° de phosphate disodique.

Quelques auteurs ont signalé que la brushite et l'hydroxylapatite ont moins tendance à adsorber irréversiblement les protéines que le phosphate tricalcique. Nous avons donc étudié le comportement chromatographique de la lipase sur ces 2 gels.

2. BRUSHITE.

L'élution de la colonne de brushite par un gradient de concentration en phosphate n'est pas à recommander. L'élution

discontinue, consistant en une série de lavages par des solutions de phosphate de plus en plus concentrées, est également difficile à régler. Néanmoins, on peut obtenir un pic actif bien formé en adsorbant une solution aqueuse de lipase sur une colonne de brushite de 6 cm de haut, en lavant la colonne avec de l'eau et en éluant directement l'enzyme par du phosphate 0,02 M pH 6,9.

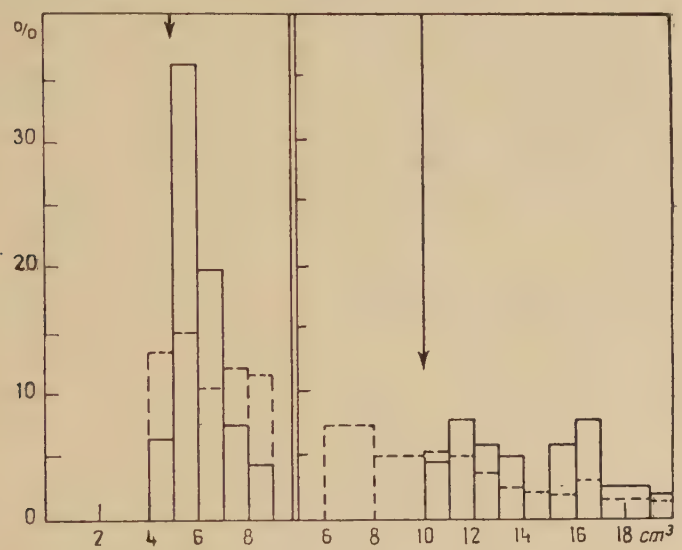


Fig. 14. — *Chromatographie de la lipase sur brushite.*

Diagramme de gauche : Colonne (1,5 × 5,5 cm) de brushite préparée selon les indications de Tiselius et coll. (57) avec 21 ml de gel tassé sous une pression de 10 cm Hg/cm². Volume mort (déterminé par l'émergence du front de phosphate) : 3 ml ; charge : 0,5 ml d'une solution aqueuse de C_3 (500 unités, activité spécifique : 258). Elution par du phosphate 0,02 M pH 6,9. La flèche verticale matérialise l'émergence du front de phosphate.

Diagramme de droite : Colonne de brushite 1,5 × 10 cm. Volume mort : 6 ml.

Le diagramme de gauche de la fig. 14 montre que l'on peut obtenir ainsi 76 p. 100 de la lipase dont 33 p. 100 (fraction centrale) sont purifiés 2,5 fois par rapport à la solution initiale. Mais le diagramme de droite de cette même figure nous apprend que, dès que la colonne est plus longue, l'élution devient irrégulière et son rendement baisse. 2 pics actifs sont à nouveau obtenus ; le sommet du 2e pic a une activité spécifique de 965, soit une purification de plus de 3 fois.

3. Hydroxylapatite.

Le gel d'hydroxylapatite est beaucoup plus stable que le gel de brushite. La fig. 15 reproduit 2 diagrammes d'élution obtenus avec des colonnes d'hydroxylapatite. Celui de droite est relatif à

une élution par gradient de concentration en phosphate. La colonne est préparée avec 300 ml de gel que l'on tasse sous une pression de 20 g/cm². On place en haut de cette colonne 1,5 ml d'une solution de C_3 (600 unités ; activité spécifique 292) dans du phosphate 0,001 M pH 6,8. L'élution se fait avec un gradient linéaire de force ionique. Le volume de la chambre de mélange est de 500 ml. La chambre de réserve contient du tampon phosphate M pH 6,8. On voit que les protéines sont bien étalées et que le pic de lipase, qui émerge quand la concentration de phosphate est comprise entre 0,046 et 0,065 M, est correctement formé. Bien que le rendement d'élution de la lipase ne dépasse pas 40 p. 100, le taux de purification atteint 2-2,5 pour 30 p. 100 de la quantité totale d'enzyme.

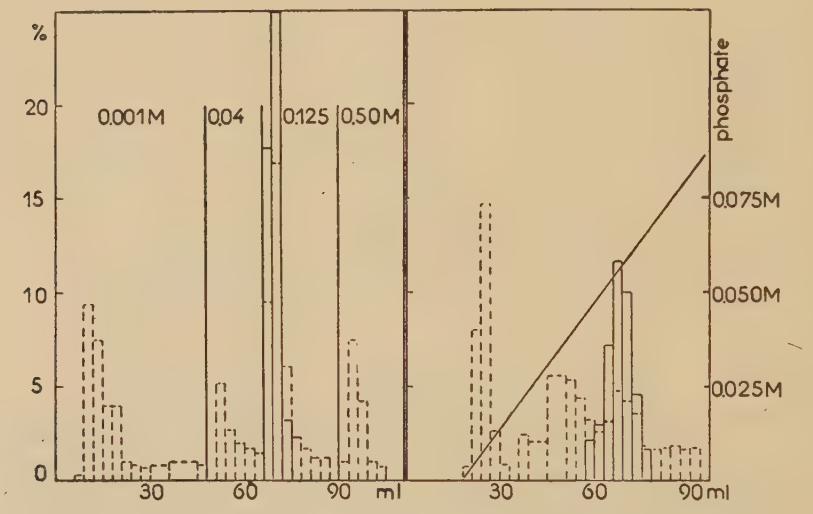


Fig. 15. — *Chromatographie de la lipase sur hydroxylapatite.*

Diagramme de droite : Colonne de 15 cm de hauteur (volume mort : 18,5 ml, débit : 18 ml/h.). Elution par gradient de concentration en phosphate pH 6,8. La droite, qui traverse le diagramme, matérialise le gradient de concentration en phosphate.

Diagramme de gauche : Colonne de 5,5 cm de hauteur (volume mort: 6,8 ml). Elution discontinue par des solutions de phosphate de plus en plus concentrées. Le point d'émergence de chaque nouveau front de concentration est indiqué par un trait vertical.

Quand un système d'élution discontinue est substitué au gradient, on constate un fait assez surprenant : la lipase ne sort plus des colonnes de 15 cm, même quand ces colonnes sont lavées avec des solutions de phosphate de concentration supérieure à 0,06 M. On est donc obligé de réduire la hauteur des colonnes à 5,5 cm et on obtient alors les résultats indiqués dans le diagramme de gauche de la fig. 15. 4 élutions successives par des solutions de phosphate 0,001, 0,04, 0,125 et 0,5 M font émer-

ger 4 pics bien distincts de protéines. La lipase sort en un pic très étroit avec le 3e pic, c'est-à-dire quand la concentration du phosphate atteint 0,125 M. Le rendement d'élution est de 49 p. 100 et le taux de purification est de 1,7 fois.

La recherche systématique des meilleures conditions d'élution nous a conduits à modifier la concentration en phosphate des éluants. La colonne est lavée successivement par des solutions de phosphate pH 6,8 de concentration croissante : 0,001 M, 0,01 M, 0,1 M et 0,5 M. Les dimensions de la colonne sont les mêmes que précédemment (hauteur : 6 cm, diamètre : 1,5 cm). Le débit est de 6 ml/h. La lipase est éluée par le phosphate 0,1 M en un pic très étroit. Le rendement d'élution est nettement amélioré puisqu'il atteint 90 p. 100. Pour des concentrations plus faibles d'éluant (0,066 et 0,083 M) le pic de lipase s'aplatit et le rendement diminue. L'élution par du phosphate 0,1 M paraît donc la meilleure. On charge la colonne avec une solution d'activité spécifique 500 contenant 1 800 unités lipase. On obtient après chromatographie dans les conditions ci-dessus définies un pic d'activité spécifique 950. Le taux de purification est d'environ 2 fois.

IV. - Utilisation de la chromatographie comme test d'homogénéité

L'un des résultats les plus intéressants de nos essais de chromatographie a été de montrer qu'une préparation de lipase d'activité spécifique 3 600, obtenue par électrophorèse de zone à pH 5,25 et homogène au cours de deux électrophorèses ultérieures à pH 5,25 et 8,0, se comportait également comme une substance homogène au cours d'une chromatographie sur hydroxylapatite. La fig. 16 rend compte de cette opération.

Une C_5 d'activité spécifique 920 donne par chromatographie 2 pics sur hydroxylapatite. Le 1er pic sort avec le phosphate 0,001 M ; le phosphate avec 0,01 M ne fait rien sortir et le pic de lipase est élué comme à l'ordinaire par le phosphate 0,1 M. Ce dernier pic est manifestement hétérogène. L'activité spécifique de la meilleure fraction est 1 400. Soumettons maintenant à ce même fractionnement une préparation partiellement purifiée par électrophorèse. Cette préparation d'activité spécifique 1 800 fournit pendant la chromatographie un seul pic. Mais ce pic est encore hétérogène. L'activité spécifique de sa meilleure fraction atteint 3 600, c'est-à-dire la valeur maximum obtenue par électrophorèse d'un C_5.

Enfin, la chromatographie d'une solution dont l'activité spécifique a été portée à 3 600 par électrophorèse fournit un pic à la fois unique et homogène. Les courbes relatives aux protéines et à l'activité lipase sont superposées (diagramme de droite de la fig. 16).

Nous pouvons donc déclarer que les solutions de lipase possédant une activité égale à 3 600 satisfont aux conditions difficiles de 2 tests d'homogénéité : le test électrophorétique et le test chromatographique.

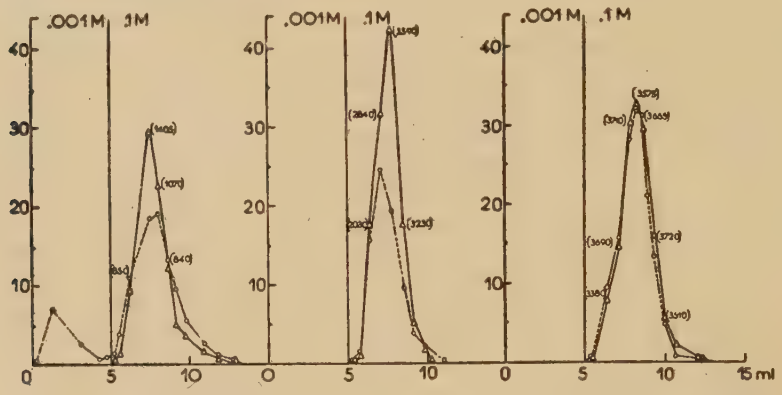


FIG. 16. — *Homogénéité chromatographique de préparations lipasiques possédant diverses activités spécifiques.*

La colonne (6,5 × 1,5 cm) d'hydroxylapatite est éluée successivement par des tampons phosphate 0,001 M, 0,01 M et 0,1 M. Débit : 6-8 ml/h., température : 1° C, volume des fractions : 1 ml.

Diagramme de gauche : Solution C_5 (1 835 unités ; activité spécifique 900).

Diagramme du milieu : Solution (1 480 unités ; activité spécifique 1 800) obtenue par électrophorèse d'une préparation C_3 à pH 5,25.

Diagramme de droite : Solution (1 210 unités ; activité spécifique 3 500) obtenue par électrophorèse d'un C_5 à pH 5,25.

CHAPITRE V

ETUDE DU SUC PANCREATIQUE DE PORC ET DE CHIEN

I. - Généralités

Nous avons entrepris la purification de la lipase à partir de pancréatine pour des raisons de commodité. C'est sans doute pour ces mêmes raisons qu'avant nous, tous ceux qui ont étudié la lipase de porc sont également partis de pancréatine. L'étude de la lipase à partir de suc pancréatique présente cependant un très vif intérêt.

Il existe en effet une discussion entre les « biochimistes » et les « physiologistes » au sujet de la conception même de leurs expériences. Les premiers cherchent par tous les moyens à ramener les phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire, par conséquent à purifier les substances biologiques et à observer leur comportement dans des conditions simples. Les physiologistes défendent alors l'image de « l'animal vivant pris dans son ensemble » et ils s'inquiètent de savoir si les molécules purifiées par les biochimistes sont bien identiques à celles élaborées par l'animal et si ces molécules se comportent « in vitro » comme « in vivo ». Ces discussions sont d'ailleurs stériles car, même si la simplification risque quelquefois d'introduire des erreurs, il faut bien commencer à comprendre des choses simples avant d'espérer comprendre des choses compliquées qui dépassent notre entendement actuel. Cependant toutes les occasions doivent être saisies de montrer que la conception « biochimique » est en fait correcte. Notre première question est donc de savoir : la lipase du suc pancréatique de porc, laquelle est certainement celle qui est déversée dans le duodénum au cours du phénomène normal de digestion est-elle identique à celle que l'on trouve dans la pancréatine de porc ?

En outre, le travail de Keller et coll. (41) vient de nous apprendre que la majeure partie des protéines du suc pancréatique sont des enzymes. Au contraire, tous les extraits que l'on peut faire à partir du pancréas ou de pancréatine contiennent une proportion considérable de protéines cellulaires. Il est donc intéressant de purifier la lipase en partant du suc, d'abord parce que cette purification est peut-être plus facile et ensuite parce que le fait d'obtenir dans les deux cas la même activité spéci-

fique maximum est un argument de poids en faveur de la pureté absolue des préparations les plus pures.

Enfin, disposant de quantités importantes de suc de porc et un peu plus tard de suc de chien, il nous a paru utile d'entreprendre une étude générale de l'équipement enzymatique du pancréas de ces deux espèces, afin de le comparer à l'équipement du pancréas de bœuf déjà précisé par Keller et coll.

La lipase du suc de porc représente environ 2,5 p. 100 des protéines totales, alors qu'elle ne représente que 0,07 p. 100 de la glande, 0,35 p. 100 de la pancréatine et environ 0,7 p. 100 des substances contenues dans l'extrait E_1. Cependant, ce dernier extrait contient beaucoup de substances non-protéiques et l'activité spécifique, laquelle se rapporte exclusivement aux protéines, est analogue dans les deux cas (65-70 pour le suc ; 50-60 pour l'extrait). Les quantités absolues de lipase présentes dans le suc de porc varient selon les conditions du prélèvement entre 90 et 200 unités par ml.

Il est intéressant de savoir que la lyophilisation du suc, nécessaire à sa bonne conservation, n'inactive pas la lipase. Elle inactive par contre presque entièrement la cholestérol-estérase extraite en général à partir de pancréatine.

II. - Equipement enzymatique du suc pancréatique de porc et de chien

Suivant les indications du travail de Keller et coll., nous avons chromatographié successivement les deux sucs sur un échangeur d'anions, puis sur un échangeur de cations. Mais pour ce dernier échange, nous avons préféré utiliser la CM-cellulose que l'Amberlite IRC-50. Une 1re colonne de DEAE-cellulose laisse passer les protéines cationiques à pH 8 et sépare les protéines anioniques. Une chromatographie sur CM-cellulose permet ensuite de séparer les protéines cationiques. La juxtaposition des 2 diagrammes donne ce que nous appelons volontiers le « panorama » enzymatique du suc considéré.

1. Equipement du porc.

a) *Réalisation de l'expérience.*

La colonne de DEAE-cellulose (70 × 0,9 cm ; poids de l'adsorbant : 5 g) est équilibrée soigneusement avec une solution de phosphate de potassium 0,005 M pH 8. Son volume mort est de 37 ml. On pèse une quantité de suc lyophilisé correspondant à 90 mg de protéines. On la dissout dans 18 ml du tampon d'équilibrage à 0°. On ajoute 2,5 mg d'inhibiteur de trypsine du soja et la quantité de diisopropylfluorophosphate (DFP) nécessaire pour atteindre la concentration 10^{-3} M. Ces additions ont pour but d'éviter l'activation du trypsinogène, laquelle provoquerait l'activation des autres précurseurs protéolytiques et l'inactivation

des autres enzymes par la trypsine ainsi formée. On agite vigoureusement pendant une heure à la température de 0°. La solution est ensuite dialysée 6 h à la chambre froide sous agitation contre 2 fois 1 litre de tampon 10^{-4} M en DFP.

La colonne est alors chargée (74 mg de protéines, 2 000 unités lipase). Elle est lavée par 2 volumes morts de tampon. On règle le débit à 10-12 ml et on élue par un gradient de force ionique, lequel est linéaire dans la partie qui nous intéresse. La chambre de mélange (560 ml) contient au début du phosphate 0,005 M. Elle reçoit du phosphate 0,55 M à pH 8 jusqu'à ce que la concentration finale du liquide d'élution soit 0,33 M. Le volume des fractions est de 4 ml. Toutes les opérations ont lieu à 1° C.

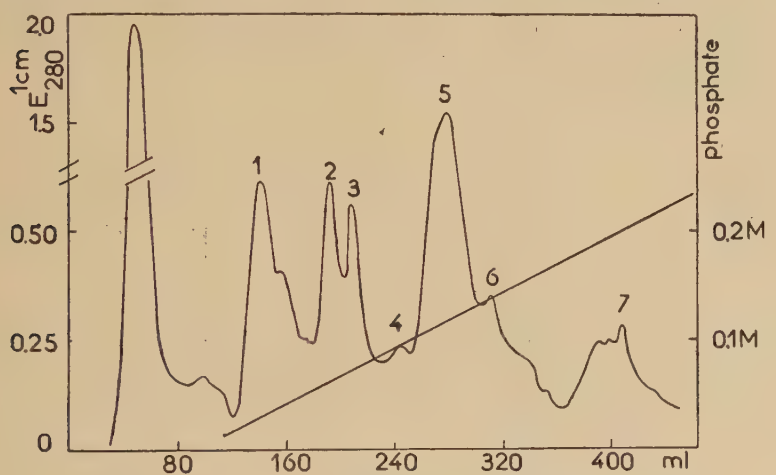


Fig. 17. — *Chromatographie du suc pancréatique de porc sur DEAE-cellulose.*

La numérotation des pics a la signification suivante : 1 : α-amylase. 2 : Lipase. 3 : Désoxyribonucléase. 4 : Activité "estérase" sur l'acétate de p-nitrophénol. 5 : Procarboxypeptidase-A. 6 : Carboxypeptidase-B. 7 : Procarboxypeptidase-B. Les ordonnées représentent la densité optique des fractions à 280 m_μ sous 1 cm. Les fractions sont de 4 ml. La droite traversant le diagramme matérialise le gradient de concentration en phosphate.

Le chromatogramme reproduit dans la fig. 17 comprend 2 parties, avant et après la mise en route du gradient. A gauche, un pic important contenant 25 p. 100 des protéines sort avec le 1er volume mort. Ce sont les protéines cationiques à pH 8. Au centre et à droite les protéines anioniques sortent les unes après les autres sous l'effet de l'augmentation de la force ionique. On trouve l'α-amylase (pic 1). La lipase (pic 2) est suivie de près par la désoxyribonucléase (pic 3). Le pic 5, très important, correspond à la procarboxypeptidase-A. Il est précédé par une petite bosse où est localisé un enzyme agissant sur l'acétate de

paranitrophénol. Le pic suivant (pic 6) est constitué par la carboxypeptidase-B. Le pic 7 est la procarboxypeptidase-B.

La cholestérol-estérase et les phosphatidases du pancréas n'ont pas pu être repérées sur ce diagramme parce qu'elles sont inhibées par DFP. Le rendement d'élution des enzymes anioniques est de 65 p. 100 (*). Le rendement global d'élution en protéines atteint donc 90 p. 100. Le rendement d'activité en lipase est de 32 p. 100. L'activité spécifique du sommet atteint 650, soit une purification de 10 fois. Le rendement en activité amylase est supérieur à 50 p. 100. L'activité spécifique du sommet du pic d'amylase est de 360. L'activité spécifique du suc étant de 45, le taux de purification est de 8 fois. Il n'est d'ailleurs pas interdit de penser que les enzymes s'inactivent partiellement pendant la chromatographie et que les taux de purification, si l'on se réfère aux protéines et non plus aux activités, soient par conséquent bien supérieurs.

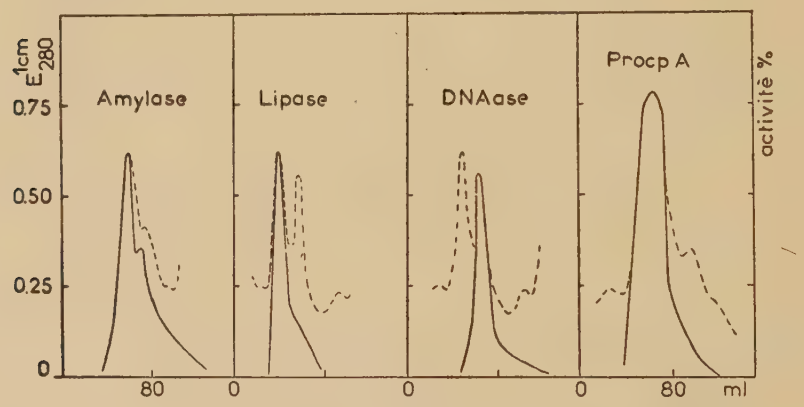


FIG. 18. — *Tracé comparé des courbes d'activités (p. 100) de quatre enzymes anioniques et des protéines correspondantes (adsorption à 280 m_μ sous 1 cm)*

Les activités enzymatiques sont représentées en trait plein et les protéines, en pointillé.
DNA-ase : désoxyribonucléase. Pro-Cp-A : procarboxypeptidase-A.

La fig. 18 permet de comparer le tracé des courbes d'activité et celui des courbes des protéines pour quatre enzymes anioniques. Nous avons fait coïncider les sommets de chaque groupe de courbes. Ce diagramme est révélateur sinon de la pureté des enzymes, seule compte à cet égard l'activité spécifique, du moins de leur comportement chromatographique.

Les protéines cationiques ont été chromatographiées sur CM-cellulose par Maurice Charles dans ce Laboratoire (67). On charge la colonne à pH 4,3, puis on l'élue par élévation du pH.

(*) Par rapport aux protéines totales de la charge

Le chymotrypsinogène sort le premier à pH 4,6, le trypsinogène à pH 5,1 et enfin la ribonucléase à pH 6,1.

Juxtaposant le diagramme des enzymes cationiques et celui des enzymes anioniques, on obtient le « panorama » complet reproduit dans la fig. 19.

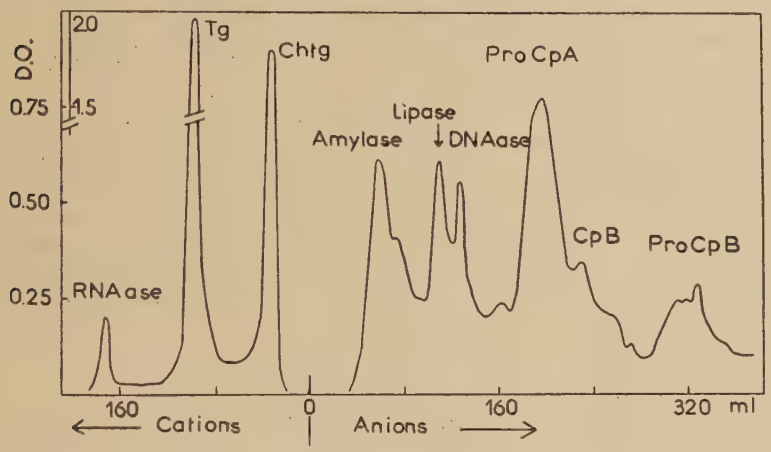


FIG. 19. — *Diagramme mixte des enzymes cationiques et anioniques du suc pancréatique de porc.*

RNA-ase : Ribonucléase. Tg : Trypsinogène. DNA-ase : Désoxyribonucléase. ChTg : Chymotrypsinogène. Pro-Cp-A : Procarboxypeptidase-A. Pro-Cp-B: Procarboxypeptidase-B. Cp-B : Carboxypeptidase-B.
Les autres conventions d'écriture sont les mêmes que dans la fig. 17.

b) *Discussion.*

(1) Aspect qualitatif.

Le tracé d'un diagramme complet des activités enzymatiques du suc pancréatique, dont la fig. 19 donne un exemple dans le cas du porc est certes fort intéressant. Il permet d'avoir sous les yeux, rangés de la façon la plus suggestive, par ordre de points isoélectriques décroissants, la majeure partie des enzymes contenus dans le suc pancréatique d'une espèce donnée.

Les différences et les analogies les plus intéressantes mises ainsi en évidence entre le suc de bœuf et le suc de porc sont les suivantes :

(*a*) Par suite vraisemblablement des habitudes alimentaires du bœuf, le suc de cet animal est si pauvre en α-amylase et en lipase, que Keller et coll. n'ont pas réussi à localiser exactement ces enzymes dans le diagramme qu'ils ont tracé. Par contre, on sait que le porc fabrique beaucoup d'amylase et de lipase puisque le pancréas de porc sert à la préparation de ces enzymes (68). Nous les trouvons en bonne place dans le diagramme de la fig. 19, exactement là où leur point isoélectrique le demande.

(*b*) A part cette différence fondamentale, l'équipement enzymatique du porc est analogue à celui du bœuf. On trouve dans les 2 sucs une quantité très large de précurseurs protéolytiques (chymotrypsinogène, trypsinogène, procarboxypeptidases A et B), de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase.

(*c*) Toutefois, il faut noter que le porc ne paraît disposer que d'un seul chymotrypsinogène cationique, alors que le bœuf en dispose de deux : le chymotrypsinogène A cationique et le chymotrypsinogène B anionique.

(*d*) Chez le bœuf et chez le porc, le seul enzyme protéolytique qui soit partiellement sous une forme active (bien qu'aucune trace de trypsine active puisse être décelée) est la carboxypeptidase-B. Il y a bien chez les deux animaux deux procarboxypeptidases A et B. Mais leur position relative sur le diagramme est inversée. Chez le bœuf, la plus anionique des procarboxypeptidases est la A. Chez le porc, c'est la B. Cette différence de position suggère des différences intéressantes dans la structure chimique des enzymes élaborés par divers animaux.

(*e*) Ces différences de structure sont confirmées par le pic de DNA-ase, lequel sort pour le bœuf avec du phosphate 0,12 M et pour le porc, avec du phosphate 0,06 M.

(*f*) Enfin, il existe dans le suc de porc une activité « estérase » encore très mal caractérisée. Cette activité a été pour la première fois séparée nettement de l'activité lipase par électrophorèse (13). Nous la trouvons ici, telle qu'elle se manifeste sur l'acétate de p-nitrophénol en solution, sous le pic 4 de la fig. 17.

(2) Aspect quantitatif.

Les expériences illustrées dans les fig. 17-19 nous apportent sur le plan qualitatif des renseignements nombreux et très importants. Toutefois, la signification quantitative de ces renseignements mérite d'être examinée de très près.

La détermination aussi précise que possible des quantités d'enzymes présents dans le suc pancréatique de diverses espèces serait du plus haut intérêt. La première idée qui vient alors à l'esprit est de mesurer l'aire des pics des diagrammes précédents et d'en déduire les quantités d'enzyme en faisant intervenir chaque fois le coefficient d'absorption U.V. des enzymes considérés. C'est d'ailleurs ce qu'a fait Keller quand elle a publié son tableau relatif aux enzymes du bœuf. Toutefois, un tel calcul exige d'une part que le rendement d'élution de chaque enzyme soit 100 p. 100 et, d'autre part, que chaque pic contienne un seul enzyme à l'état pur, autrement dit que, à l'intérieur de chaque pic, l'activité spécifique soit constante et égale à la valeur maximum. Or, le rendement d'élution des enzymes du bœuf sur DEAE-cellulose et Amberlite IRC-50 ne semble pas mauvais.

Mais, Keller n'a pas déterminé l'activité spécifique de ces pics. Dans le cas du porc, le rendement d'élution de certains enzymes est relativement bas et la fig. 18 nous apprend que l'activité spécifique est loin d'être constante à l'intérieur des pics. La seule technique vraiment rationnelle est donc : (*a*) de mesurer spectrophotométriquement la quantité totale des protéines contenues dans un volume donné de suc, de prendre cette valeur pour base 100 ; (*b*) de mesurer l'activité de chaque enzyme dans le suc total avant chromatographie et convertir cette activité en mg d'enzyme toutes les fois que l'on connaît l'activité spécifique de l'enzyme pur.

Dans le tableau III, nous donnons les p. 100 des enzymes du bœuf, tels qu'ils sont donnés par Keller, c'est-à-dire calculés à partir de l'aire des pics et les p. 100 des enzymes de porc calculés par l'aire des pics et, toutes les fois que cela est possible, par l'activité.

TABLEAU III

Essais de comparaison quantitative entre l'équipement enzymatique des pancréas de bœuf et de porc

Enzymes	P. 100 des protéines totales		
	Cas du porc		Cas du bœuf
	Par l'aire des pics	Par l'activité	Par l'aire des pics
Trypsinogène	12	18	14
Chymotrypsinogène	5	13	(A) 16 (B) 16
Ribonucléase	—	—	2,4
Amylase	13	7,5	< 2
Lipase	6,5	2,5	Très faible
Désoxyribonucléase	5,6	—	1,4
« Estérase »	3,8	—	—
Procarboxypeptidase-A ..	18	—	19
Procarboxypeptidase-B + carboxypeptidase-B ...	16	—	7

D'après ce qui vient d'être dit, toute comparaison précise entre ces chiffres est impossible à l'heure actuelle. Toutefois, la

richesse particulière du suc de porc en amylase et en lipase, déjà signalée plus haut, apparaît ici clairement. La proportion de 2,5 p. 100 pour la lipase peut sembler modeste pour un enzyme chargé d'hydrolyser toutes les graisses de la ration. Mais le « turnover » de la lipase est très élevé (13). En outre, il est probable que le porc dispose de moins d'endopeptidases pancréatiques que le bœuf, cette relative pauvreté étant peut-être compensée par une abondance plus grande de pepsine dans l'estomac. Le bloc des exopeptidases A et B est aussi considérable chez le porc que chez le bœuf, avec vraisemblablement encore plus du partenaire B.

2. Equipement du chien.

a) *Généralités.*

La fistulation du pancréas de chien est une opération classique en chirurgie vétérinaire. L'étude du suc pancréatique du chien a donc pu être entreprise beaucoup plus tôt que chez le porc ou chez le bœuf, notamment par Byrne et coll. (43) et par Grossberg et coll. (69). Ce dernier auteur étudie par électrophorèse en veine libre la répartition des activités enzymatiques du suc pancréatique (lipase, amylase, protéase). Cette méthode n'est cependant pas préparative et l'identification des différents pics est assez sommaire. Il trouve 2 pics portant l'activité lipase et 3 pics possédant l'activité amylase, 2 autres groupes de pics se partagent l'activité protéolytique. Nous avons donc pensé qu'il était intéressant d'étudier de façon plus précise le suc pancréatique de chien comme nous l'avions fait pour le porc.

L'activité spécifique de la lipase dans le suc pancréatique de chien est d'environ 60, c'est-à-dire du même ordre que chez le porc. Les activités spécifiques du chymotrypsinogène du trypsinogène du suc sont identiques à celles du porc (respectivement 0,4 et 0,1). Nous n'avons pas pu doser la ribonucléase dans ce suc. Comme chez le porc, la cholestérol-estérase est inactivée par lyophilisation.

b) *Chromatographie sur DEAE-cellulose.*

Notre première chromatographie a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le suc de porc. Nous avons alors constaté que les protéines anioniques étaient mal étalées et qu'il fallait par conséquent diminuer de moitié la pente du gradient. La fig. 20 donne les résultats ainsi obtenus.

Le premier pic (10 p. 100) qui est le pic des protéines cationiques semble dépourvu de chymotrypsinogène. La seule activité décelable est celle du trypsinogène lequel paraît d'ailleurs s'y trouver sous un état de grande pureté (activité spécifique potentielle : 0,43). Le pic 2 est l'amylase. Le pic 3 représente la lipase. Mais il est mal séparé de ses voisins. Le pic 4 est constitué par la désoxyribonucléase. Le pic 5 est du chymotrypsinogène. Il est

assez curieux de constater à ce sujet que le suc de bœuf contient 2 chymotrypsinogènes, l'un anionique et l'autre cationique, le suc de porc en contient un seul cationique et le chien, un seul anionique. Les pics 6, 9 et 10 sont de la procarboxypeptidase ou de la carboxypeptidase A. Les pics 7 et 8 sont de la procarboxypeptidase ou de la carboxypeptidase B. L'activité spécifique de ce chymotrypsinogène de chien est du premier coup assez élevée (2,3 au lieu de 3,0 pour l'enzyme pur du porc). La lipase de chien se comporte par contre très mal sur DEAE-cellulose. Le rendement de son élution est très faible (10 p. 100) et sa séparation des autres pics est mauvaise. Une nouvelle baisse de la pente du gradient conduirait sans doute à une inactivation encore plus grande.

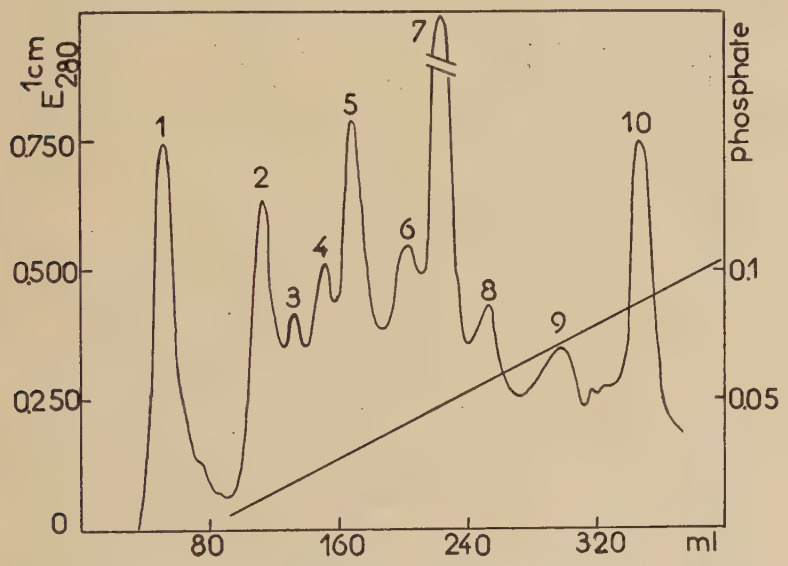


Fig. 20. — *Chromatographie du suc pancréatique de chien sur DEAE-cellulose.*

La numérotation des pics correspond à l'existence des activités enzymatiques suivantes : 1 : Trypsinogène. 2 : α-amylase. 3 : Lipase. 4. : Désoxyribonucléase. 5 : Chymotrypsinogène. 6, 9 et 10 : Procarboxypeptidase-A ou carboxypeptidase-A. 7 et 8 : Procarboxypeptidase-B ou carboxypeptidase-B.

c) *Chromatographie sur CM-cellulose.*

Les mauvais résultats obtenus pour la lipase avec la DEAE-cellulose nous ont incité à effectuer une chromatographie du suc de chien sur CM-cellulose.

Une colonne (70×0,9 cm ; 8 g d'adsorbant ; volume mort : 24 ml) est équilibrée avec du tampon acétate 0,005 M pH 5,4. La quantité de suc correspondant à 90 mg de protéines est mise en solution dans 18 ml de tampon et on ajoute à cette solution

2,5 mg d'inhibiteur de trypsine. On dialyse cette solution pendant une nuit contre 2 fois 1 l. de tampon. Un précipité assez abondant se forme dans le sac de dialyse. On le centrifuge. Ce précipité représente 40 p. 100 des protéines totales, mais il contient relativement peu de lipase (20 p. 100). La colonne est alors chargée (46 mg de protéines. 1 160 unités lipase), et lavée par 2 volumes morts de tampon. Les conditions opératoires sont les mêmes qu'avec la DEAE-cellulose. L'élution par gradient se fait en deux temps. Dans un 1er temps, la concentration du tampon dans la chambre d'alimentation est 0,55 M. Puis, quand la concentration de l'éluant atteint 0,19 M, la chambre est remplie

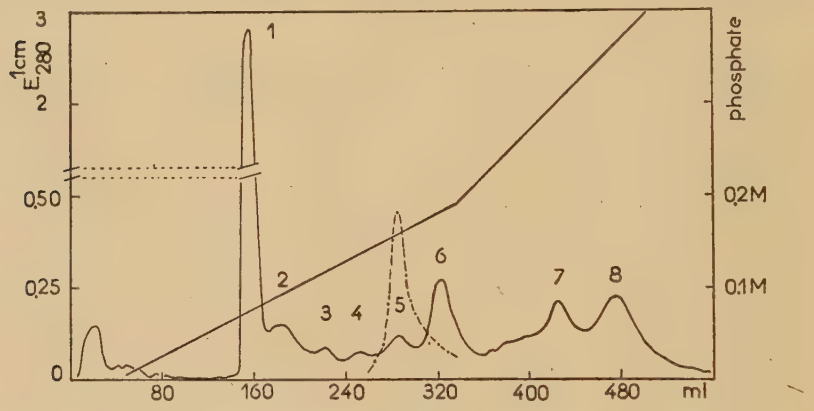


FIG. 21. — *Chromatographie du suc pancréatique de chien sur CM-cellulose.*

La courbe en traits pleins représente la densité optique à 280 m_μ sous une épaisseur de 1 cm. La courbe en traits interrompus représente l'activité lipase (p. 100). Les fractions sont de 4 ml. Les deux portions de droite qui traversent le diagramme matérialisent le gradient de concentration provoquant l'élution.

La numérotation des pics est faite de la façon suivante : 1 : Carboxypeptidases A et B et leurs zymogènes. 2 : Désoxyribonucléase. 3 : Chymotrypsinogène. 4 : Non identifié. 5. : Lipase. 6 : Chymotrypsinogène. 7 : α-amylase. 8 : Trypsinogène.

de tampon 1,1 M. La pente du gradient devient alors double. Le chromatogramme reproduit dans la fig. 21 montre qu'il ne sort presque rien avec le volume mort, il faut une légère augmentation de force ionique même pour éluer les protéines anioniques. Le premier grand pic est constitué par les protéines anioniques (carboxypeptidases et leurs zymogènes), soit 29 p. 100 des protéines totales. Le pic 2 est constitué par la DNA-ase, le pic 3 possède une faible activité chymotrypsinogène (activité spécifique : 1,0). Le pic 4 n'a pas été identifié, le pic 5 est la lipase. Ce pic est assez bien formé et le rendement d'élution est bien meilleur que précédemment (60 p. 100). L'activité spécifique du sommet est 1 280, ce qui représente une purification de plus de

20 fois par rapport au suc. Le pic suivant (pic 6) est le chymotrypsinogène, ce qui confirme l'existence d'un chymotrypsinogène anionique chez le chien. Ce pic est 4 fois plus important que le pic 3, son activité spécifique atteint 2,5.

Le changement de pente du gradient provoque l'élution de l'amylase (pic 7) et du trypsinogène (pic 8) qui sort bien à sa place avec une activité spécifique de 0,51. Le pic principal du chymotrypsinogène et celui du trypsinogène semblent très bien se comporter sur CM-cellulose. Ils sont élués dans un état de pureté élevé.

Le rendement d'élution globale des protéines est de 88 p. 100. L'intérêt principal de la technique réside dans le fait que l'on obtient directement à partir du suc 3 enzymes importants dans un état avancé de pureté : le trypsinogène, le chymotrypsinogène et la lipase. Cependant, l'aspect quantitatif du problème ne peut pas être abordé, d'abord pour les raisons exposées dans le cas du porc et, d'autre part, parce que 40 p. 100 des protéines du suc pancréatique du chien précipitent à pH 5,4.

III. - Essais de purification de la lipase à partir du suc pancréatique du porc

L'une des raisons qui nous ont conduits à étudier le suc pancréatique de porc était de connaître sa richesse en lipase en vue de sa purification ultérieure. La lipase du suc possède une activité spécifique du même ordre que celle de l'extrait E_1, résultat important puisqu'il montre que la purification de la lipase à partir du suc n'ouvre pas à priori des perspectives meilleures que la purification à partir de la pancréatine.

1. Méthodes conventionnelles de fractionnement.

a) *Précipitation par SO_4Am_2.*

Une quantité suffisante de suc lyophilisé pour permettre l'obtention d'une solution à 2 p. 100 en protéines est dissoute dans du tampon Tris 0,05 M pH 8, 10^{-3} M en DFP. A pH alcalin, la poudre est complètement soluble. Le DFP évite l'inactivation de la lipase due à la trypsine. Nous avons tenté de purifier cette solution en suivant le schéma mis au point pour la pancréatine. Mais nous nous sommes aperçus dès le premier stade que ce schéma devait être modifié, le mélange de protéines accompagnant la lipase n'étant pas le même dans les 2 cas.

La première précipitation se fait à 0,5 S. Le culot lavé est repris par un volume de tampon Tris 0,1 M pH 8 égal au volume initial. On précipite successivement cette solution à 0,2 et 0,4 S. On garde la fraction précipitant entre 0,2 et 0,4 S. La lipase de cette fraction a une activité spécifique de 100, le rendement est de 80 p. 100.

b) *Précipitation acétonique.*

Si l'on se place dans des conditions identiques à celles du schéma de purification de la pancréatine, on constate qu'une concentration de 49 p. 100 d'acétone ne précipite que la moitié de la lipase. Pour diminuer la solubilité de l'enzyme, on amène donc le pH à son point isoélectrique en reprenant le culot C_2 par de l'acétate 0,05 M pH 5,3. Le culot acétonique est lavé par une solution tampon-acétone à la même concentration et à la température de —12° C. Il est ensuite repris par de l'eau, le pH de cette solution est amené à 6 et l'insoluble est éliminé par centrifugation. L'activité spécifique du surnageant est de 300-350. Le rendement est de 70 p. 100. Les performances de ces deux premiers stades sont donc analogues à celles des deux stades correspondants de la purification de la pancréatine.

c) *Adsorption sur gel de phosphate de calcium et sur gel d'alumine.*

Nous n'avons rien modifié au cours de ces deux derniers stades de la purification préliminaire. L'activité spécifique de la lipase obtenue atteint finalement 750-780 avec un rendement de 50 p. 100. Le rendement global à partir du suc est de 28 p. 100 en lipase.

Si l'on essaie, comme au cours de la purification de la pancréatine, de réaliser la précipitation acétonique de la lipase en présence de SO_4Am_2, on élimine des impuretés gênantes qui permettent au C_5 d'atteindre une activité spécifique de 950-1 000. Mais le rendement global en lipase n'est plus alors que de 15 p. 100.

2. Électrophorèse de zone sur amidon (*).

La fig. 22 reproduit 4 diagrammes d'électrophorèse. Le premier concerne le suc pancréatique total. L'électrophorèse est réalisée dans une colonne d'amidon au sein d'un tampon acétate 0,025 M pH 5,25 contenant des ions Ca++ à la concentration 0,005 M. La durée de l'expérience est de 21 h, le gradient de potentiel de 7,9 volts/cm. Le pic d'activité lipase est bien formé, l'activité spécifique du sommet est d'environ 450, soit une purification de 8 fois. Mais le diagramme des protéines est plat, il n'y a pas de séparation nette entre les différents enzymes comme dans le cas de la chromatographie.

Le 2e diagramme illustre l'électrophorèse d'une solution de C_3 (activité spécifique : 250). La durée de l'électrophorèse est cette fois de 47 h, le gradient de potentiel étant de 7 volts/cm. L'activité spécifique du sommet du pic dépasse 1 600, soit un taux de purification supérieur à 6 par rapport au C_3 initial.

(*) Ces électrophorèses ont été réalisées au Laboratoire par M. L. Sarda.

Le 3e diagramme représente l'électrophorèse d'un C_5 d'activité spécifique 744 pendant 42 h sous un gradient de potentiel de 9,9 volts/cm. Le tampon d'électrophorèse est le même que précédemment, mais il ne contient pas d'ions Ca++. Le pic traîne sur la droite. L'activité spécifique de son sommet atteint néanmoins 3 300, c'est-à-dire à peu près la valeur maximum obtenue après électrophorèse d'un C_5 en provenance de la pancréatine. Mais par suite de son étalement plus fort vers la droite, le pic n'est pas homogène comme dans ce dernier cas.

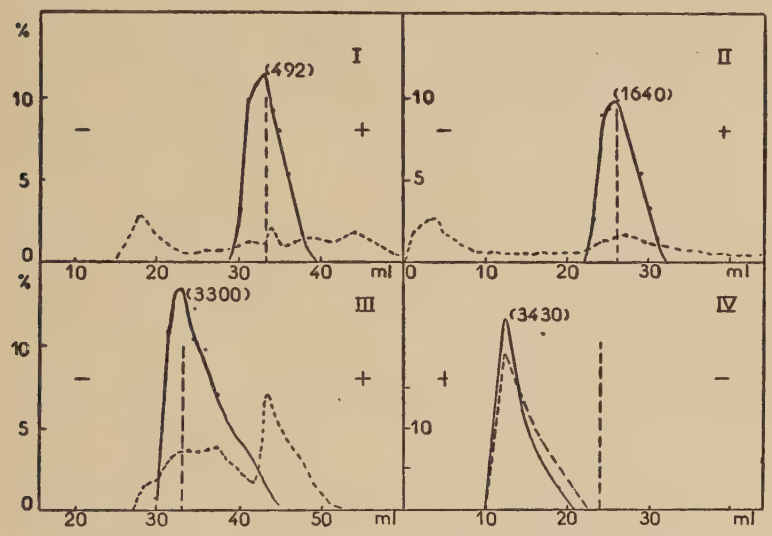


Fig. 22. — *Electrophorèses de solutions de lipase purifiée à partir du suc pancréatique du porc.*

Diagramme I : Electrophorèse du suc pancréatique.
Diagramme II : Electrophorèse de solution du culot C_3.
Diagramme III : Electrophorèse de solution du culot C_5.
Diagramme IV : Réélectrophorèse d'une solution d'activité spécifique 2 800.

Les traits verticaux en pointillé représentent la position initiale des substances dans la colonne, compte tenu du flot électroosmotique. Les ordonnées correspondent aux pourcentages par ml d'éluats (calculés par rapport aux quantités totales introduites dans la colonne) de la lipase et des protéines retrouvées dans chaque fraction. Les abscisses donnent des volumes d'éluat en ml. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'activité spécifique de chaque fraction. L'activité lipase est représentée en traits pleins, les protéines sont en pointillés.

Enfin, le diagramme IV de la fig. 22 a été obtenu en soumettant les meilleures fractions du diagramme III (activité spécifique : 2 800) à une nouvelle électrophorèse de 24 h (gradient de potentiel : 7,4 volts/cm) dans du tampon 0,025 M en véronal pH 8 et 0,005 M en Ca++. Partant d'une préparation lipasique dont l'activité spécifique ne dépassait pas 2 800, il n'était pas

possible d'espérer obtenir un pic réellement homogène. D'autre part, les résultats de l'expérience ont été notablement perturbés par une inactivation assez importante de la lipase au cours de l'électrophorèse. Néanmoins, il est extrêmement intéressant de constater que : (*a*) la lipase issue du suc et la lipase issue de la pancréatine se comportent de façon identique pendant l'électrophorèse. Les deux substances sont donc vraisemblablement les mêmes, (*b*) l'activité spécifique maximum correspondant au sommet du pic est 3 430, soit une valeur très voisine de l'activité maximum 3 600 atteinte en partant de pancréatine. Le fait de trouver une limite supérieure commune au cours de la purification de deux mélanges totalement différents suggère que l'activité spécifique 3 600 est celle de la lipase pure.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Comme il a été dit dans l'Avant-Propos, le but principal du présent travail a été, d'une part, d'obtenir la lipase de porc dans un état assez purifié pour qu'une électrophorèse ultérieure puisse fournir un produit pur et, d'autre part, d'étudier le comportement chromatographique de la lipase afin de préciser certaines propriétés de cet enzyme et de savoir si la chromatographie constituait un moyen efficace de purification. Entre temps, il est apparu nécessaire de purifier la lipase à partir du suc pancréatique, ce qui nous a amené à en collecter des quantités assez importantes et nous a incité à étudier l'équipement enzymatique de ce suc ainsi que, par extension, celui du chien.

Cette thèse comporte donc naturellement trois grandes parties : (1) Essais de purification préliminaires de la lipase de porc en partant de pancréatine et en utilisant principalement les techniques conventionnelles de précipitation fractionnée et d'adsorption sélective. (2) Evaluation des performances de la chromatographie en tant que moyen de purification ultérieure de la lipase et en tant que test d'homogénéité des préparations purifiées par électrophorèse. (3) L'étude qualitative et, dans une certaine mesure quantitative, de l'équipement enzymatique du suc pancréatique de porc et de chien, ainsi que la description d'une technique permettant de purifier la lipase à partir de suc de porc jusqu'à une limite analogue à celle atteinte par purification de cet enzyme à partir de pancréatine.

Nous donnons ci-dessous la liste des résultats principaux obtenus au cours de notre étude et les conclusions que nous pensons pouvoir en tirer.

1. Nous étudions tout d'abord de façon systématique l'application au problème de la purification de la lipase, de toutes les techniques générales proposées pour la purification des protéines et, en particulier, des enzymes. Nous examinons successivement les procédés de précipitation fractionnée par les sels neutres et les solvants organiques. La précipitation par le sulfate d'ammonium est très efficace car elle purifie la lipase, augmente sa stabilité et élimine les acides nucléiques. L'alcool n'est pas très efficace et il exerce un effet dénaturant très sensible. L'acétone par contre, en présence ou en l'absence d'ions Ca^{++}, permet une bonne purification.

2. D'autres techniques classiques ou déjà recommandées pour la purification de la lipase, telles que : la dénaturation d'impuretés protéiques par un chauffage ménagé ; la précipitation soi-disant sélective de la lipase par variation de pH ou abaissement de la force ionique, se sont révélées inefficaces. Par contre, nous avons constaté que, dans des conditions expérimentales précises, la lipase s'adsorbe mieux que les impuretés protéiques qui l'accompagnent, sur un gel de phosphate tricalcique et moins bien sur un gel d'alumine C_γ.

3. Un schéma cohérent de purification a pu ainsi être mis sur pied. Il comporte : une préparation particulièrement soignée de la pancréatine de porc, une extraction à l'eau de la pancréatine, une double précipitation par SO_4Am_2, une précipitation par l'acétone en l'absence de calcium, l'élimination de quelques impuretés à pH 6, une adsorption sélective sur phosphate tricalcique et un traitement par l'alumine Cγ. On obtient ainsi de façon reproductible un taux de purification d'environ 20 fois par rapport aux protéines de l'extrait initial ou d'environ 40 fois par rapport aux substances totales de cet extrait. Nous avons donc éliminé, au cours de la purification, 95 p. 100 des protéines accompagnant la lipase dans ces extraits et 97,5 p. 100 des impuretés totales.

La lipase ainsi obtenue a une activité spécifique d'environ 1 000. Elle n'est pas pure. Mais par une simple électrophorèse de zone sur amidon, elle permet l'obtention d'une lipase possédant une activité spécifique de 3 600 et présentant plusieurs des caractéristiques d'une substance pure.

4. Diverses études effectuées avec des homogénats de pancréas frais nous ont permis : (1) d'envisager la possibilité d'une localisation de la lipase de porc à l'intérieur de « granules de zymogènes », (2) de montrer que la purification de la lipase à partir de pancréas frais est plus difficile qu'à partir de pancréatine et (3) de nier l'existence d'une « prolipase » au sein du pancréas qui, selon certains auteurs, serait un précurseur inactif de la lipase.

5. Nous avons essayé de chromatographier la lipase sur certains dérivés ioniques de la cellulose (CM et DEAE-celluloses), sur une résine acide (Amberlite IRC-50) et sur divers gels de phosphate de calcium (phosphate tricalcique, brushite et hydroxylapatite). Nous avons recherché des conditions expérimentales susceptibles de donner de bons résultats, soit au cours d'une chromatographie d'équilibre, soit au cours d'une élution discontinue ou par gradient. Tous ces essais ont montré que le comportement chromatographique de la lipase de porc n'est pas très favorable, par suite des difficultés d'élution de l'enzyme. Ces difficultés font baisser le rendement de l'élution et empêchent de ce fait d'obtenir des taux de purification vraiment satisfaisants. Toutefois, la chromatographie sur hydroxylapatite combinée avec une élution discontinue par des solutions de phosphate 0,001 M, 0,01 M et 0,1 M, constitue un test très sensible pour contrôler l'homogénéité des solutions de lipase les plus pures.

6. Grâce à l'aide du Service de Chirurgie Expérimentale de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, un porc a pu être muni d'une fistule pancréatique permanente, ce qui a permis la collection d'environ 5 litres de suc et d'étudier par conséquent, non seulement la purification de la lipase à partir du suc de porc, mais aussi l'équipement enzymatique complet de ce suc.

7. La purification de la lipase de porc n'est pas plus facile quand on part du suc que quand on part de pancréatine. Dans les deux cas, on obtient le même enzyme et on atteint la même limite supérieure pour l'activité spécifique, soit 3 600. Cette limite correspond donc vraisemblablement à l'activité de l'enzyme pur.

8. Deux chromatographies successives des protéines anioniques du suc sur DEAE-cellulose et des protéines cationiques sur CM-cellulose, ont permis de tracer des « panoramas » enzymatiques du suc de porc et de comparer ces « panoramas » avec ceux obtenus récemment par Keller aux U.S.A. avec le suc de bœuf. Des différences et des analogies intéressantes ont été constatées : le suc de porc contient beaucoup plus de lipase et d'α-amylase. Il renferme par contre un seul chymotrypsinogène, lequel est cationique. La position dans les chromatogrammes du même enzyme élaboré par les deux espèces est quelquefois différente, ce qui suggère des différences de structure.

9. Une étude semblable a enfin été effectuée, sur DEAE et CM-celluloses, des enzymes du suc pancréatique de chien, aimablement fourni par les Etablissements Sinbio. Le suc de chien est également plus riche que le suc de bœuf en α-amylase et en lipase. Il paraît ne contenir, comme le suc de porc, qu'un seul chymotrypsinogène, lequel est cette fois anionique. Relativement pauvre en endopeptidases (chymotrypsine et trypsine), il est au contraire très riche en exopeptidases (carboxypeptidases A et B).

BIBLIOGRAPHIE

1. R. Willstaetter et E. Waldschmit-Leitz. — *Z. Physiol. Chem.*, 125 (1923), 132.
2. P. Rona et L. Michaelis. — *Biochem. Z.*, 31 (1911), 345.
3. E. Bamann et E. Ullman. — *Biochem. Z.*, 312 (1942), 9.
4. R. Ammon et M. Jaarma. — *The Enzymes*, vol. 1, 390.
5. H. Sobotka et D. Glick. — *J. Biol. Chem.*, 105 (1934), 199.
6. P. Rona et A. Lasnitzki. — *Biochem. Z.*, 174 (1924), 343.
7. F. Schonheyder et K. Volqvartz. — *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952), 407.
8. P. Desnuelle, M.J. Constantin et J. Baldy. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 37 (1955), 285.
9. B. Borgström. — *Biochemical problems of lipids.*, 179.
10. G. Gomori. — *Proc. Soc. Exptal. Biol. Med.*, 58 (1945), 362.
11. R.M. Archibald. — *J. Biol. Chem.*, 165 (1946), 443.
12. M.M. Nachlas et A.M. Seligman. — *J. Biol. Chem.*, 181 (1949), 343.
13. L. Sarda et P. Desnuelle. — *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958), 513.
14. C. Artom et L. Reale. — *Boll. Soc. Ital. Biol.* spec., 10 (1935), 883.
15. A.C. Frazer et H.G. Sammons. — *Biochem. J.*, 39 (1945), 122.
16. P. Desnuelle, M. Naudet et J. Rouzier. — *Arch. Sci. Physiol.*, 2 (1948), 71.
17. P. Desnuelle, M. Naudet et J. Rouzier. — *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948), 561.
18. P. Savary et P. Desnuelle. — *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956), 349.
19. F.H. Mattson et L.W. Beck. — *J. Biol. Chem.*, 219 (1956), 735.
20. B. Borgström. — *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953), 557.
21. P. Savary, J. Flanzy et P. Desnuelle. — *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957), 414.
22. P. Savary et P. Desnuelle. — *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959), 26.
22 *bis* F.H. Mattson et E.S. Lutten. — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958), 868.
23 M. Kunitz. — *J. Gen. Physiol.*, 33 (1950), 349.

24. M. Laskowski. — *J. Biol. Chem.*, 166 (1946), 555.
25. E.J. Cohn, F.R.N. Gurd et D.M. Surgenor. — *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950), 465.
26. A.H. Palmer. — *J. Biol. Chem.*, 104 (1934), 359.
27. H.B. Vickery. — *J. Biol. Chem.*, 140 (1941), 613.
28. O. Warburg et W. Christian. — *Biochem. Z.*, 303 (1939), 40.
29. P.S. Tayer. — *Journ. of Bacteriology*, 66 (1953), 657.
30. D.H. Spackman, E.L. Smith et D.M. Brown. — *J. Biol. Chem.*, 212 (1955), 255.
31. A. Rimon et B. Shapiro. — *Biochem. J.*, 71 (1959), 621.
32. T.P. Singer et E.B. Kearney. — *Arch. Biochem.*, 29 (1950), 190.
33. A. Martin et R. Synge. — *Biochem. J.*, 35 (1941), 1358.
34. S.W. Mayer et E.R. Tompkins. — *J. Am. Chem. soc.*, 69 (1947), 2859.
35. A. Martin et R.R. Porter — *Biochem J.*, 49 (1951), 251.
36. S.M. Partridge. — *Nature*, 168 (1952), 923.
37. C.H. Hirs, S. Moore et W.H. Stein. — *J. Biol. Chem.*, 200 (1953), 493.
38. H.A. Sober et E.A. Peterson. — *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956), 751.
39. H.A. Sober et E.A. Peterson. — *Federation Procedings*, 17 (1958), 1116.
40. P.J. Keller, E. Cohen et H. Neurath. — *J. Biol. Chem.*, 230 (1958), 905.
41. P.J. Keller, E. Cohen et H. Neurath. — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958), 344.
42. L.E. Hokin. — *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955), 379.
43. G.M. Byrne, J.I. Phynney, M. Schachter et E.G. Young. — *Abstract XVII Int. Physiol. Cong. (Copenhaguen)*, 142 (1950).
44. M.P. Munro et M.D. Thomas. — *Am. J. Physiol.*, 145 (1945), 140.
45. M.I. Grossman, H. Greengard et AC. Ivy. — *Am. J. Physiol.*, 138 (1943), 676.
46. P.J. Keller, E. Cohen et H. Neurath. — *J. Biol. Chem.*. 234 (1959), 311.
47. R. Heidenhain. — *Arch. F. D. Ges. Physiol.*, 10 (1875), 557.
48. P. Grützner. — *Arch. F. D. Ges. Physiol.*, 12, (1876), 285.
49. H.H. Hernandez et I.L. Chaikoff. — *J. Biol. Chem.*, 228 (1957), 447.
50. D. Fairbairn. — *J. Biol. Chem.*, 157 (1945), 633.
51. G. Noelting et P. Bernfeld. — *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948), 286.
52. M. Kunitz. — *J. Biol. Chem.*, 164 (1946), 563.
53. M. Rovery, C. Fabre et P. Desnuelle. — *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953), 547.
54. C. Huggins et C. Lapides. — *J. Biol. Chem.*, 170 (1947), 467.
55. R. Willstaetter et H. Kraut. — *Ber.*, 56 (1923), 1117.
56. D. Keilin et E.F. Hartree. — *Proc. Roy. Soc.* (London), B 124 (1938), 397.
57. A. Tiselius, S. Hjerten et O. Levin. — *Arch. Bioch. Biophys.*, 65 (1956), 155.
58. D. Glick et C.G. King. — *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933), 2445.
59. R.A. Boissonnas. — *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948), 1577.
60. E.B. Herr Jr et J.B. Sumner. — *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, A. II, 60 (1955), 64.
61. L. Sarda, G. Marchis-Mouren et P. Desnuelle. — *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957), 425.
62. G. Marchis-Mouren, L. Sarda et P. Desnuelle. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 83 (1959), 309.
63. M.L. Amon. — *J. Gen. Physiol.*, 20 (1937), 663.
64. O. Rosenheim. — *J. Phys.*, 40 (1910), 14.
65. D.L. Woodhouse. — *Biochem. J.*, 26 (1932), 1512.
66. S.M. Swingle et A. Tiselius. — *Biochem. J.*, 48 (1951), 171.
67. M. Charles, M. Rovery, et P. Desnuelle. — *Biophys. Biochim. Acta* (sous presse).
68. E. Fischer. — *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948), 1834.
69. A. Grossberg, A. Komarov et H. Shay. — *Am. J. Physiol.*, 168 (1952), 269.

Vu et approuvé,
Marseille, le .... octobre 1959,
Le Doyen de la Faculté des Sciences :
P. ROUARD.

Vu et permis d'imprimer,
Aix, le octobre 1959
Le Recteur de l'Académie
J .BLACHE.